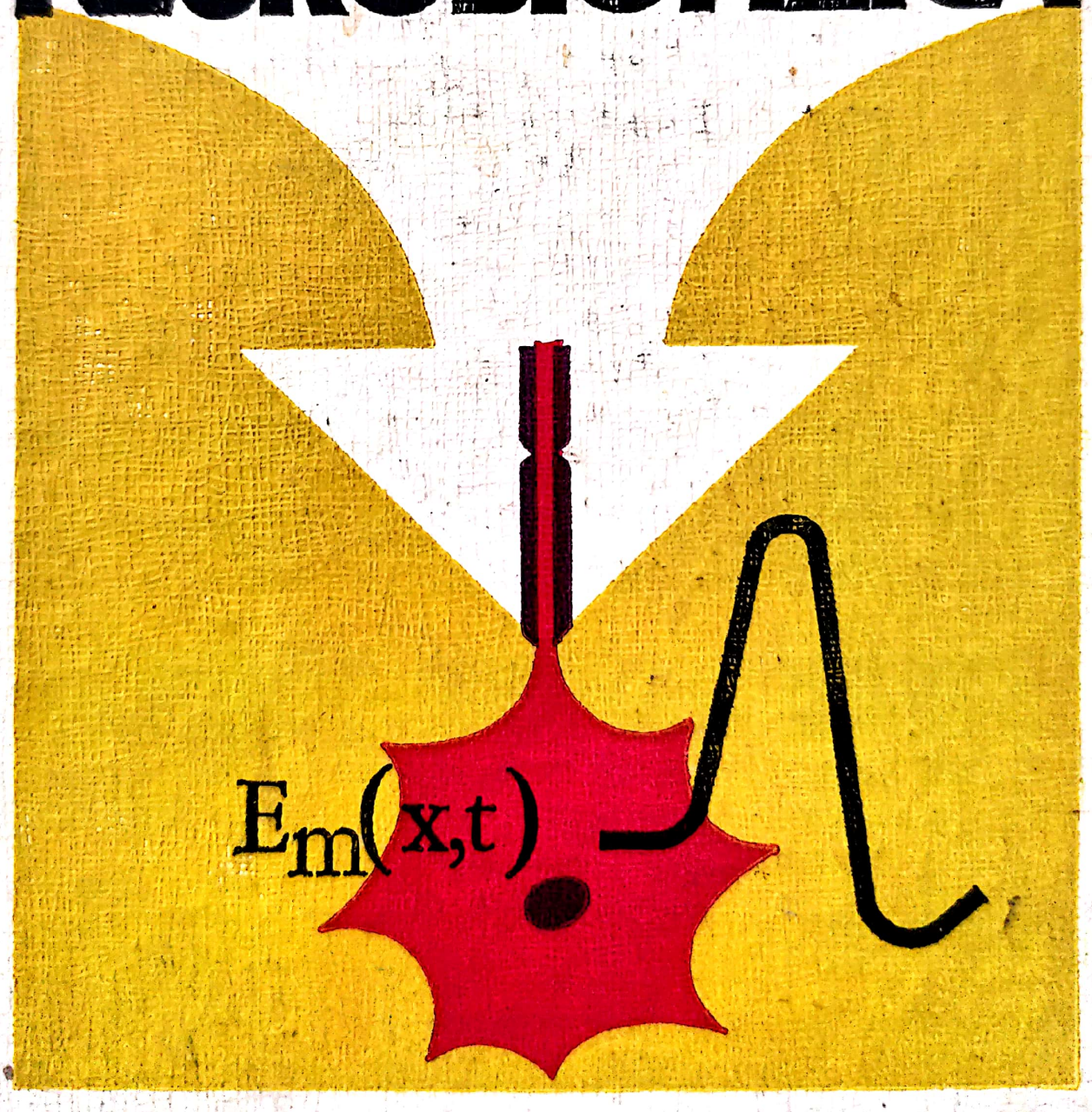
V. Vasilescu – D.-G. Mărgineanu

INTRODUCERE ÎN NEUROBIOFIZICĂ



Scanned with OKEN Scanner

V. Vasilescu ■ D.-G. Mărgineanu

INTRODUCERE ÎN NEUROBIOFIZICĂ

EDITURA ŞTIINŢIFICĂ ŞI ENCICLOPEDICĂ
Bucureşti, 1979

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Posibilitatea pe care „Prefața" o oferă autorilor de a se adresa direct cititorului spre a-i prezenta obiectivele esențiale și rațiunile care i-au ghidat în alcătuirea lucrării lor este extrem de binevenită deoarece, în cazul acestei monografii, se cuvine a defini însuși termenul NEUROBIOFIZICĂ și domeniul științific pe care îl subsumează.

Capacitatea reflexivă unică a omului și setea sa de cunoaștere l-au adus de foarte mult timp în fața problemei fundamentale „ce este viața?", căreia au căutat să-i dea un anumit răspuns, evident în modalități specifice foarte variate, filozofii, poeții și oamenii de știință. Printre multiplele aspecte ale abordării științifice a acestei probleme, un loc central îl ocupă încadrarea vieții în ansamblul general al naturii, prin înțelegerea mecanismelor fizico-chimice elementare, din a căror sinteză se realizează biologicul, ca treaptă calitativ superioară de organizare a materiei. Efortul de înțelegere unitară a naturii, neconfundabil cu reducționismul, reprezintă originea gnoseologică majoră a biofizicii — domeniu al științelor biologice care studiază tocmai acele mecanisme fizico-chimice fundamentale și constituie baza unor aplicații de importanță majoră pentru medicină, agricultură și chiar pentru tehnologie.

Fiind rezultatul aplicării tot mai largi a tehnicilor fizico-chimice de studiere și al descrierii aprofundate a fenomenelor biologice prin concepte fizice, biofizica are o problematică foarte largă ajungînd ca, într-un timp relativ scurt de la constituire, să reprezinte nu „unul dintre" domeniile biologiei, ci, mai degrabă, stadiul actual și următor de evoluție a biologiei în ansamblu.

În cadrul spectrului foarte larg de probleme, atît fundamentale cît și aplicative, ale biofizicii, de o semnificație

cu totul aparte este studiul fenomenelor legate de funcționarea sistemului nervos. Prin *neurobiofizică* vom defini *studiul mecanismelor fizico-chimice implicate în realizarea funcțiilor sistemului nervos*, studiu ce oferă baza de înțelegere aprofundată a neurobiologiei și neurofiziologiei în ansamblu, dar care nu se identifică cu acestea. Într-adevăr, deoarece mecanismele fizico-chimice sînt subordonate funcționării celulei, problematica neurobiofizicii se situează — cel puțin în acest stadiu de evoluție a cunoștințelor — la nivel celular și subcelular. Din acest motiv, de circumscriere pe cît posibil riguroasă a domeniului, cititorul va găsi tratate în suficient detaliu, în cap. II—VI, diferitele aspecte ale excitabilității celulare, fără a se face însă mai mult decît simple referiri la problemele de neurofiziologie macroscopică. Aceeași optică a ghidat și alcătuirea capitolului introductiv dedicat evoluției istorice a cunoștințelor de factură neurobiofizică.

În intenția autorilor, termenul „introducere", inclus în titlul acestei monografii, nu desemnează nivelul de abordare a problematicii propuse, ci limitarea ei în extensiune, lăsîndu-se deschisă posibilitatea unor dezvoltări ulterioare. Ultimul capitol („Aplicații și perspective ale neurobiofizicii") schițează unele conexiuni dintre subiectele tratate în cap. II—VI și alte domenii, propunînd cititorului deschideri către o problematică mult mai largă.

Această „Introducere în neurobiofizică" este destinată unei game largi de cititori, atît specialiști, cît și în formare: fiziologilor, biofizicienilor, biochimiștilor, medicilor neurologi, electroniștilor interesați de probleme de biofizică, precum și studenților de la facultățile de medicină și de biologie. Conștienți de faptul că noțiuni ce pot fi foarte familiare cititorilor de o anumită formație ar putea lipsi altora, am căutat pe tot parcursul lucrării să definim conceptele utilizate și am inclus o anexă cuprinzînd noțiunile foarte uzuale și simbolurile nedefinite în text, grupate pe domenii: biologie, fizică și chimie fizică, matematică.

Dorința majoră care ne-a ajutat să desfășurăm eforturile implicate de realizarea acestei cărți a fost de a contribui la progresul învățămîntului și al cercetării științifice din țara noastră, oferind cititorilor imaginea unui domeniu științific de mare perspectivă, aflat în plină efervescență. Mulțumim Editurii științifice și enciclopedice pentru concursul dat în ceea ce privește apariția în bune condiții a prezentei monografii.

AUTORII

CUPRINS

Prefaţă 5

Capitolul I: **Evoluţia cunoştinţelor de neurobiofizică** 11

I.1. „Preistoria" studierii excitabilităţii 11

I.2. Influxul nervos ca fenomen electric 13

I.2.1. Studierea excitaţiei la nivel celular 18

I.2.2. Studierea proceselor neelectrice asociate cu influxul nervos 19

I.3. Recepţia şi transmiterea excitaţiei între celule. 21

I.3.1. Funcţionarea receptorilor 21

I.3.2. Transmiterea excitaţiei între celule 23

Bibliografie 26

Capitolul II: **Membranele şi rolul lor în funcţionarea celulelor excitabile** 27

II.1. Structura membranelor biologice 28

II.1.1. Modele ale structurii membranelor biologice . . 29

II.1.2. Filmele lipidice bimoleculare 33

II.1.3. Ionofori şi canale ionice 36

II.1.4. Compoziţia membranelor axonale 38

II.1.5. Multitudinea membranelor artificiale excitabile . 39

II.1.6. Rolul apei în structura şi funcţia membranelor biologice 42

II.2. Potenţialul de repaus al celulelor 43

II.2.1. Microelectrozii intracelulari 44

II.2.2. Potenţialul de repaus şi distribuţia ionilor în celulă 45

II.3. Transportul activ 51

II.3.1. Dependenţa transportului activ de metabolismul energetic celular. 52

II.3.2. Distincţia dintre fluxurile ionice pasive şi active 53

II.3.3. ATP-aza de transport a sodiului şi potasiului . . 57

II.3.4. Transportorii membranari de ioni 59

Scanned with OKEN Scanner

II.4. Descrierea membranelor prin circuite echivalente 61
Bibliografie. 64

Capitolul III: **Influxul nervos** 67
III.1. Fenomenologia activității electrice a fibrelor nervoase 68
III.1.1. Metodele microelectrofiziologice de bază . . . 69
III.1.2. Potențiale locale și propagate 74
III.1.3. Propagarea recurentă și saltatorie în fibrele nervoase 77
III.1.4. Viteza de conducere a impulsului nervos. . . . 80
III.2. Fenomenologia activității electrice a trunchiului nervos 81
III.3. Curenții electrici implicați în propagarea influxului nervos (teoria ionică a excitației) 84
III.3.1. Propagarea electrotonică (pasivă) a semnalelor electrice în membrana celulară; proprietățile de cablu ale membranei 85
III.3.2. Propagarea regenerativă (activă) a semnalelor în membranele excitabile; ecuațiile Hodgkin-Huxley 89
III.4. Căile de trecere a ionilor prin membrana axonală în timpul excitației. 97
III.4.1. Farmacologia canalelor ionice și distribuția lor în membrana axonală 98
III.4.2. Structura canalelor ionice 102
III.4.3. Curenții „de poartă" 103
III.5. Modificările optice asociate cu propagarea impulsului nervos 108
III.5.1. Modificări de birefringență 108
III.5.2. Modificări ale difuziei luminii 110
III.5.3. Variații ale fluorescenței și absorbției de lumină 112
III.6. Ipoteze asupra mecanismelor impulsului nervos . . . 115
III.6.1. Ipoteze biochimice 116
III.6.2. Ipoteze macromoleculare 120
III.6.3. Ipoteza dipolară a excitației nervoase 124
III.6.4. Mecanismele biofizice implicate în teoria ionică a excitației 127
Bibliografie. 130

Capitolul IV: **Metabolismul energetic și problemele termodinamice ale funcționării nervului** 133
IV.1. Metabolismul energetic al nervului 134
IV.2. Consumul de oxigen și producerea de căldură în nerv 136
IV.3. Energia necesară transportului activ în nerv 141

IV.4. Procese disipative de energie în nerv în timpul potenţialului de acţiune 146
IV.4.1. Disiparea de energie datorită fluxurilor ionice din timpul potenţialului de acţiune 147
IV.4.2. Disiparea de energie prin redistribuirile intramembranare de sarcină electrică 149
IV.4.3. Modificările energetice asociate cu ciclul de permeabilitate al membranei excitabile 150
Bibliografie. 155

Capitolul V: **Transmisia sinaptică** 158
V.1. Condiţiile structurale pentru transmisia sinaptică prin mediatori chimici şi prin curent electric 160
V.2. Succesiunea de procese din care constă transmisia chimică sinaptică 165
V.2.1. Sinteza şi hidroliza enzimatică a acetilcolinei . . 167
V.2.2. Veziculele cu mediatori chimici 168
V.2.3. Mecanismul de spargere a veziculelor cu mediatori 170
V.2.4. Caracterul cuantificat al eliberării mediatorului 174
V.2.5. Difuzia mediatorului chimic 178
V.2.6. Receptorul sinaptic de AcCh 179
V.3. Potenţialele postsinaptice locale 183
V.3.1. Caracteristicile canalului ionic pe care îl deschide AcCh în membrana postsinaptică a plăcii motorii 187
V.3.2. Fenomenele fizico-chimice de la nivelul membranei postsinaptice 191
V.4. Sinapse cu transmisie electrică 194
V.5. Funcţia sinaptică, tipuri de sinapse şi de meditatori 197
Bibliografie. 199

Capitolul VI: **Biofizica funcţionării celulelor receptoare** 202
VI.1. Evoluţia formaţiunilor receptoare 203
VI.2. Caracteristicile stimulilor şi codificarea lor 206
VI.2.1. Tipurile de stimuli şi de celule receptoare . . . 207
VI.2.2. Codificarea intensităţii şi a distribuţiei în spaţiu şi timp a stimulilor 212
VI.3. Principiile generale ale structurii şi funcţionării celulelor receptoare 215
VI.3.1. Biopotenţialele celulelor receptoare 216
VI.4. Informaţia senzorială 220
VI.4.1. Măsura cantităţii de informaţie 222

Scanned with OKEN Scanner

VI.4.2. Cantitatea de informaţie transmisă prin ansambluri de impulsuri nervoase 223
VI.5. Procesele biofizice de la nivelul receptorilor 225
VI.5.1. Ipoteze generale 225
VI.5.2. Rolul membranelor în generarea potenţialelor de receptor 227
VI.6. Durerea: tipuri şi mecanisme de recepţie 229
VI.6.1. Caracterizarea senzaţiilor de durere 230
VI.6.2. Dolorimetria 230
VI.6.3. Recepţia şi conducerea senzaţiilor de durere . . 232
VI.7. Mecanismele fotorecepţiei 235
VI.7.1. Structura fotoreceptorilor la vertebrate . . . 237
VI.7.2. Fotochimia vederii 240
VI.7.3. Biopotenţialele fotoreceptorilor 242
Bibliografie 246

Capitolul VII: **Aplicaţii şi perspective ale neurobiofizicii** 249
VII.1. Caracteristici speciale ale dinamicii celulare a neuronilor 250
VII.1.1. Interacţii ale neuronilor cu celulele gliale . . . 251
VII.1.2. Transportul axoplasmic de substanţe 252
VII.1.3. Autoexcitabilitatea neuronilor 254
VII.2. Mecanisme ale activităţii nervoase superioare 256
VII.2.1. Procesele de învăţare şi memoria 257
VII.2.2. Transferul chimic al informaţiei obţinute prin învăţare 262
VII.3. Mecanisme de acţiune a medicamentelor asupra sistemului nervos 264
VII.3.1. Mecanismul de acţiune a substanţelor anestezice 265
Bibliografie 269

Glosar de simboluri şi noţiuni uzuale 271
Indice de termeni 275
Summary 281

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL I

EVOLUȚIA CUNOȘTINȚELOR DE NEUROBIOFIZICĂ

Deoarece prin *neurobiofizică* înţelegem studiul naturii concrete a celor mai profunde mecanisme de funcţionare a sistemului nervos, domeniul acestei ştiinţe se situează în mod evident la nivel celular. De aceea, schiţînd evoluţia cercetărilor pe care le încadrăm astăzi în neurobiofizică, nu ne vom ocupa de istoria acumulării cunoştinţelor asupra funcţionării sistemului nervos în ansamblu, ci numai de dinamica datelor experimentale şi a concepţiilor referitoare la generarea şi propagarea excitaţiei în nerv, transmiterea excitaţiei între celule şi recepţia stimulilor din mediul extern.

O caracteristică generală a întregii evoluţii a concepţiilor despre natura excitabilităţii organismelor este că, în toate perioadele, aceste concepţii au reflectat stadiul în care se găseau cunoştinţele fizico-chimice ale epocii.

I.1. „PREISTORIA" STUDIERII EXCITABILITĂȚII

Omul şi-a dat seama de foarte mult timp de facultatea sa şi a altor animale de a căpăta o imagine complexă asupra lumii înconjurătoare şi a reacţiona pe baza influenţelor pe care aceasta le exercită asupra organelor lor de simţ. Toate încercările de a explica natura ultimă a acestei sensibilităţi nu s-au putut însă baza pînă la sfîrşitul secolului al XVIII-lea decît pe raţionamente eventual fundate pe date anatomice şi clinice, dar cel mai adesea impregnate puternic de filozofia dominantă în respectiva perioadă şi lipsite de orice bază experimentală directă, de aceea le încadrăm în „preistoria" cunoaşterii excitabilităţii.

În jurul anului 520 î.e.n., Alcmeon din Crotona descrie pe bază de disecţii nervul optic pe care el îl consideră un

canal ce conduce senzaţiile de la ochi la creier. Democrit (460—370 î.e.n.) a explicat funcţia organelor de simţ pe baze atomiste. El afirmă că obiectele din lumea înconjurătoare emit atomi care constituie o imagine a obiectului de pe care s-au desprins. Aceste imagini pătrund prin organele de simţ, concepute de Democrit ca nişte canale, şi ajung la suflet.

Marele medic din Roma secolului al II-lea, Galen (131—201 e.n.), a identificat 7 din cele 12 perechi de nervi cranieni şi a făcut distincţia dintre nervii senzitivi şi motori. Referitor la conducerea de către sistemul nervos a funcţionării corpului, Galen considera că o parte din „spiritul vital", rezultat din amestecul sîngelui cu aerul de la plămîn, ajunge la creier unde este transformat în „spirit animal". Spiritul animal, principiul mişcării şi al sensibilităţii, este distribuit prin porii nervilor de la ventriculii cerebrali în toate părţile corpului, la muşchi şi la organele de simţ periferice.

Noţiunea de „spirit animal", provenind din aceea de „suflu vital", avea să fie folosită pînă în secolul al XVIII-lea pentru explicarea funcţionării sistemului nervos. Varianta cea mai elaborată a acestor explicaţii îi aparţine lui René Descartes (1596—1650). El afirmă că spiritele animale iau naştere din sînge prin filtrare în glanda pineală (epifiza) şi curg din ventriculii cerebrali prin nervi (care sînt tuburi prevăzute cu valve ce permit reglarea fluxurilor). Trebuie remarcat faptul că, în ciuda caracterului mecanicist naiv al acestor concepţii ale lui Descartes, spiritul animal la care se referă el este de natură materială, fiind un fluid foarte subtil, supus legilor fizicii. De aceea se poate considera că Descartes a anticipat (deşi într-o formă care astăzi pare fantezistă) noţiunea modernă de influx nervos.

Cu toate că naturalistul olandez Jan Swammerdam (1637—1680) a arătat pe preparate nerv-muşchi izolate că iritarea nervului produce contracţia muşchiului, fără ca acesta să fie în legătură cu creierul (de unde ar veni spiritul animal) şi fără ca muşchiul să-şi mărească volumul datorită umflării sale de către respectivul fluid, doctrina spiritului animal va fi definitiv înlocuită cu aceea de influx nervos de natură electrică abia de către L. Galvani în 1791.

Descartes a adus o foarte importantă contribuţie la dezvoltarea fiziologiei nervoase introducînd noţiunea de reflex. De exemplu, reflexul de apărare la excitanţi termici dureroşi este descris astfel : căldura pune în mişcare pielea care trac-

ţionează firele nervoase care se termină în porţiunea respectivă. La rîndul lor, firele nervoase trag de porţiunea din creier din care pornesc, deschizînd pori cerebrali prin care pătrunde spirit animal ce va ajunge la muşchi determinînd contracţia. Cu toată formularea mecanicistă (dealtfel foarte explicabilă în contextul epocii), meritul deosebit al noţiunii de reflex introdusă de Descartes este că prezintă activităţile nervoase drept răspunsuri ale organismului la excitanţii din mediu. Mai tîrziu, fiziologul ceh Jiri Prohaska (1749—1820) va afirma în mod explicit „reflectarea impresiilor" externe ajunse la centrii nervoşi, în nervii motori corespunzători.

În cadrul preistoriei influxului nervos amintim şi concepţia lui Isaac Newton (1642—1727), după care nervii sînt solizi şi transparenţi, iar excitaţia se propagă prin ei ca o undă luminoasă prin eter. Merită, de asemenea, a fi remarcată ipoteza lui William Croone (1633—1684) că anumite substanţe care trec din nervi reacţionează cu substanţe specifice din muşchi, producînd contracţia.

I.2. INFLUXUL NERVOS CA FENOMEN ELECTRIC

Ipoteza că electricitatea ar fi fluidul care circulă prin nervi aparţine lui Alexander Monro (1697—1762) şi lui Stephen Hales (1677—1761), dar ideea existenţei unei *electricităţi animale* a fost afirmată pe larg şi susţinută cu dovezi experimentale de către Luigi Galvani (1737—1798) în lucrarea *De viribus electricitatis in motu musculari* (1791), care poate fi considerată drept „actul de naştere" al electrofiziologiei. Lucrînd cu preparate neuromusculare de broască, Galvani a constatat nu numai că electricitatea atmosferică poate produce contracţia, dar că muşchiul se contractă şi atunci cînd între el şi nervul său se închide un circuit exterior format din două metale diferite. Galvani a emis ipoteza că prin circuitul exterior trece electricitatea animală produsă de către ţesuturi: nervul şi muşchiul sînt încărcaţi cu electricitate de sens opus care atunci cînd sînt puse în legătură prin circuitul metalic produc contracţia. Încă din 1774, H. Cavendish (1731—1810) a demonstrat că şocul simţit la atingerea peştilor electrici (*Electrophorus*, *Torpedo* etc.) este datorat unui curent electric produs de aceşti peşti, deci afirmase ideea generării de electricitate de către organismul animal. De asemenea, cu ajutorul unor butelii de

Leyda, el a construit un model funcţional al torpilei de mare, model pe care l-a perfecţionat pînă cînd dădea aceleaşi şocuri ca şi peştele. Merită a fi menţionat faptul că acesta este primul exemplu de folosire a metodei *modelării*, şi anume a modelării fizice, în cercetarea biologică.

Ideea existenţei unei diferenţe de potenţial între nerv şi muşchi şi, în general, a producerii de electricitate de către ţesuturi (*bioelectrogeneza*) a fost puternic combătută de Alessandro Volta (1745—1827), care a descoperit că întotdeauna la contactul dintre două metale diferite apare o diferenţă de potenţial electric. Volta susţinea că între nerv şi muşchi nu este nici o diferenţă de potenţial electric şi că în experienţele lui Galvani muşchiul de broască se contractă fiind excitat de trecerea prin el a curentului produs numai de diferenţele de potenţial de contact dintre metale. Disputa ştiinţifică pe această temă a persistat zeci de ani, pînă cînd Alexander von Humboldt (1769—1859), refăcînd experienţele, a arătat că este vorba de două fenomene deosebite: electricitate de contact între metale diferite şi electricitate animală intrinsecă. Remarcăm deci naşterea simultană a două domenii ştiinţifice: studiul electricităţii (fizice) şi al bioelectricităţii, legătura permanentă a acestora fiind exprimată prin continua dezvoltare a electrofiziologiei, iar în ultimele decenii şi a electrofiziologiei celulare.

Dovezi certe ale producerii de electricitate de către ţesuturile animale au fost aduse de Carlo Matteucci (1811—1868) şi Emil DuBois-Reymond (1818—1896). În 1842, Matteucci a descris fenomenul numit „contracţie secundară": se iau două preparate neuromusculare de broască, nervul unuia fiind plasat pe o pereche de electrozi metalici iar al celuilalt în contact cu muşchiul primului preparat. Atunci cînd primul nerv este excitat electric, se contractă ambii muşchi, ceea ce arată că odată cu contracţia, în muşchiul primului preparat apare un curent electric ce îl poate excita pe cel de-al doilea. În 1843, DuBois-Reymond, lucrînd cu un galvanometru cu ac magnetic, de mare sensibilitate, a stabilit că între o porţiune lezată şi una intactă a unui nerv sau muşchi circulă un curent ce se menţine constant un timp destul de lung (pînă cînd ţesutul se degradează), numit *curent de leziune*. Sensul acestui curent arată că porţiunea lezată este încărcată negativ faţă de cea intactă (fig. II.7.). Atunci cînd nervul sau muşchiul sînt excitate electric, intensitatea curentului de leziune scade, deci apar *curenţi de acţiune*, al

căror semn arată dispariţia diferenţei de potenţial dintre cele două porţiuni.

În 1850, marele fiziolog, fizician şi matematician Hermann von Helmholtz (1821—1894) a reuşit performanţa epocală de a măsura viteza de propagare în nerv a procesului fizico-chimic — încă necunoscut — care este suportul curenţilor de acţiune, adică viteza de propagare a influxului nervos. El a lucrat tot cu preparate neuromusculare de broască. Aplicarea pe nerv a curentului stimulant face să treacă printr-un galvanometru balistic un curent de intensitate cunoscută, care este întrerupt de contracţia muşchiului. Deoarece deflexia galvanometrului balistic este proporţională cu durata de trecere a curentului, Helmholtz a putut să măsoare intervalul foarte scurt de timp de la stimularea nervului pînă la contracţia muşchiului. El a constatat că acest interval variază proporţional cu lungimea nervului între electrodul de stimulare şi muşchi, calculînd viteze de 25—30 m/s la temperatura camerei. Peste 75 de ani, cînd oscilografele catodice au permis vizualizarea directă a intervalului de latenţă dintre aplicarea unui stimul şi apariţia excitaţiei la o distanţă oarecare de punctul de stimulare, rezultatele lui Helmholtz au fost confirmate pe deplin.

După ce în 1859 Eduard Pflüger (1829—1910) stabilise că excitaţia se produce la catod la aplicarea curentului şi la anod la întrerupere*, în 1879 Ludimar Hermann (1838—1914) a făcut ipoteza că excitaţia se propagă în nerv de la locul de stimulare în ambele sensuri prin *curenţi electrici locali* care se închid prin interiorul nervului între zonele adiacente încărcate electric cu sarcini de semne contrare (fig. III.8.).

Un moment important în evoluţia concepţiilor asupra bioelectricităţii l-a reprezentat aplicarea (în 1902) de către Julius Bernstein (1839—1917) a teoriei pilelor de concentraţie pentru descrierea biopotenţialelor. Deoarece în interiorul celulelor este mai mult potasiu decît în exterior, pentru ca acest ion să fie în echilibru electrochimic, interiorul celulei trebuie să fie încărcat electric negativ faţă de exterior. Calculînd, pe baza concentraţiilor potasiului, potenţialul de echilibru electrochimic (§ II.2.2.), el a găsit valori care concordau bine cu potenţialele de demarcaţie. Bernstein a

* În 1939, N. Bărbulescu a propus o demonstraţie fizico-chimică a legilor lui Pflüger („Rev. Gén. Sci.", *50*, 57).

explicat excitaţia prin creşterea bruscă şi reversibilă a permeabilităţii membranei (care în repaus este permeabilă în mod selectiv pentru K^+) faţă de toţi ionii, ceea ce face ca potenţialul de repaus să se anuleze. Ulterior, s-a dovedit că distribuţia ionică asimetrică între interiorul şi exteriorul celulelor nu reflectă un simplu echilibru electrochimic şi, de asemenea, că excitaţia nu înseamnă doar anularea potenţialului de repaus, ci chiar o inversare a încărcării electrice (fig. III.6.). Cu toate acestea, ideea de bază a lui Bernstein că bioelectricitatea este rezultatul unor fenomene de membrană, şi anume a distribuţiei ionice între citoplasmă şi lichidul interstiţial, a fost de importanţă fundamentală, orientînd toată dezvoltarea contemporană a neurobiofizicii.

În primele decenii ale secolului al XX-lea, s-au acumulat numeroase date experimentale asupra excitabilităţii nervilor şi muşchilor. Dintre acestea, menţionăm evidenţierea faptului că impulsul nervos din fiecare axon respectă legea „tot sau nimic". Această lege a fost stabilită în 1871 de H. P. Bowditch (1840—1911) referitor la modul în care se contractă inima. În 1902, F.Gotch a analizat cu un electrometru capilar foarte sensibil curenţii de acţiune ai nervului de broască şi a ajuns la concluzia că amplitudinea curentului unui nerv întreg este determinată, în primul rînd, de numărul de fibre intrate în activitate. În 1909, Keith Lucas a constatat că într-un muşchi scheletal mic, inervat de puţine fibre nervoase, tăria contracţiei musculare creşte în trepte atunci cînd muşchiul este stimulat prin intermediul nervului, concluzia ambelor rezultate fiind că excitaţia decurge la nivelul fiecărei fibre după legea „tot sau nimic". Tot în 1909, L. Lapicque a stabilit parametrii experimentali ce caracterizează excitabilitatea nervului (subcapitolul III.2.).

De un larg răsunet s-a bucurat elaborarea, în 1916, de către R. Lillie (după o idee formulată iniţial de W. Ostwald) a unui model fizico-chimic al excitaţiei nervoase, constînd dintr-o sîrmă de fier plasată în HNO_3 concentrat. Fierul se acoperă cu un strat de oxid, iar cînd o zonă a sîrmei este „activată" prin zgîrierea oxidului, agenţi chimici sau curent electric, se produce o reacţie locală propagabilă de-a lungul sîrmei, urmată de o fază de revenire. Pe baza observaţiilor făcute pe acest model, Lillie a sugerat în 1925 conducerea saltatorie în fibrele mielinizate, dar în ceea ce priveşte înţelegerea mecanismului propagării excitaţiei nervoase, modelul nu a fost de vreo utilitate efectivă nu numai datorită

deosebirilor sale evidente faţă de nerv, ci şi fiindcă nu au fost complet elucidate înseşi procesele fizico-chimice care se petrec în model.

O primă încercare de a elabora o teorie cantitativă a excitaţiei nervoase îi aparţine lui H. A. Blair, care în 1932 a presupus că la catodul excitator are loc o creştere a concentraţiei unei anumite substanţe excitatoare. În următorii ani, N. Rashevsky (în 1933) şi, în mod independent, A. M. Monnier (în 1934) şi A. V. Hill (în 1936) au elaborat teoria „celor doi factori". Această teorie presupune că în fibrele nervoase există o substanţă excitatoare şi una inhibitoare, excitaţia avînd loc atunci cînd concentraţia substanţei excitatoare este mai mare. Stimulul electric ar produce creşterea în diferite raporturi a concentraţiei ambelor substanţe, variaţiile celor două concentraţii fiind date de ecuaţii diferenţiale de ordinul întîi, cu constante cinetice specifice pentru fiecare. Atît ipoteza substanţei excitatoare, cît şi a celor doi factori au apărut sub influenţa experienţelor privind excitaţia şi inhibiţia directă a inimii de către substanţe eliberate prin stimularea nervilor aferenţi (capitolul V).

Principalul rezultat al acestor teorii îl constituie deducerea relaţiei intensitate — durată pentru stimulii prag, însă ele sînt complet formale, atît datorită ipotezelor de la care pornesc, cît şi fiindcă nu iau în considerare însuşi potenţialul de acţiune, care este principala manifestare a excitabilităţii. Monografia publicată de A. M. Monnier în 1934 : *L'excitation éléctrique des tissus. Essai d'interprétation physique* (Hermann & Cie, Paris) în care sînt descrise în detaliu rezultatele experimentale asupra excitabilităţii nervului şi se propun circuite electrice echivalente cu nervul, poate fi considerată drept un punct final al cercetărilor pe trunchiul nervos în totalitatea sa. Deoarece el este alcătuit dintr-un număr mare de fibre nervoase, răspunsul electric al trunchiului nervos nu poate da informaţii suficient de aprofundate care să permită descifrarea mecanismelor fizico-chimice intime ale excitaţiei. Pentru realizarea acestui obiectiv se impunea trecerea la lucrul pe fibre nervoase unice. O etapă de tranziţie în această direcţie pot fi considerate lucrările lui J. Erlanger şi H. S. Gasser din deceniul al patrulea, prin care s-au evidenţiat în cadrul nervogramei, înregistrată pe osciloscop, mai multe unde reprezentînd contribuţiile fibrelor cu diferite viteze de conducere şi care au diferite diametre.

Scanned with OKEN Scanner

I.2.1. Studierea excitaţiei la nivel celular

După 1934, G. Kato şi colaboratorii săi, I. Tasaki şi T. Takeuchi, au reuşit să izoleze fibre nervoase mielinizate şi au demonstrat că în acestea conducerea excitaţiei are loc saltatoriu, de la un nod Ranvier la altul. Pentru aceasta, ei au făcut experienţe de narcotizare a nodurilor şi internodurilor şi au reuşit să măsoare chiar curenţii ionici dintr-un nod (§ III.1.3.).

O importanţă cu totul deosebită a avut-o descrierea în 1936 de către J. Z. Young a axonului gigant de calmar, care s-a dovedit imediat a fi un excelent material biologic de studiere a impulsului nervos. Diametrul mare al acestei fibre nervoase ($\approx$ 500 μm la speciile din genul *Loligo* şi pînă la 1500 μm la *Dosidicus gigas*) a permis plasarea de electrozi interni şi urmărirea modificărilor compoziţiei axoplasmei datorită conducerii impulsurilor, deci s-au putut corela potenţialele electrice cu fluxurile ionice.

Atît utilizarea acestui material biologic foarte avantajos, cît şi o serie întreagă de noi tehnici de lucru, care au devenit posibile în special datorită dezvoltării electronicii, au făcut ca încă în 1952 să se obţină o imagine detaliată a proceselor care au loc în nerv în timpul excitaţiei. Astfel, în 1939 K.S. Cole şi H. J. Curtis au evidenţiat scăderea impedanţei axonului gigant în timpul activităţii, scădere produsă de creşterea conductanţei ionice a membranei axonale, confirmînd prin aceasta în mod direct ipoteza lui Bernstein că membrana axonală este mult mai permeabilă în activitate faţă de repaus. În 1949 G. N. Ling şi R. W. Gerard au perfecţionat tehnica microelectrozilor intracelulari din sticlă, cu ajutorul cărora au devenit posibile înregistrări directe şi multiple ale potenţialelor în repaus şi în activitate. În acelaşi an, G. Marmont şi K. S. Cole au elaborat tehnica potenţialului fixat (*clamp-voltage*), prin care, menţinîndu-se o diferenţă de potenţial constantă între interiorul şi exteriorul axonului, se anulează curenţii capacitivi, astfel încît curentul prin membrana axonală aparţine numai fluxurilor ionice. Tot în 1949, R. D. Keynes a publicat primele rezultate privind măsurarea cu izotopii radioactivi ^{42}K şi ^{24}Na a fluxurilor ionice asociate cu excitaţia. Toate aceste studii au culminat cu cercetările lui A. L. Hodgkin şi A. F. Huxley care, împreună cu B. Katz, au analizat dependenţa curenţilor ionici prin membrana axonală de potenţialul transmem-

branar, iar apoi au separat în cadrul curentului ionic total componenta de sodiu de cea de potasiu şi au putut descrie într-o manieră cantitativă riguroasă propagarea excitaţiei prin cinetica specifică a permeabilităţii membranei excitabile pentru sodiu şi potasiu. Ciclul de patru lucrări de Hodgkin şi Huxley apărute în „Journal of Physiology" în 1952 conţine formularea cvasicompletă a teoriei ionice a excitaţiei, teorie care constituie fundamentul biofizic al neurofiziologiei contemporane. Teoria ionică este analizată pe larg în capitolul III, iar în subcapitolul III.6. se face o evaluare critică a acestei teorii în raport cu toate celelalte ipoteze asupra naturii impulsului nervos. De aceea, vom sublinia în acest context doar faptul că o serie de concepte introduse de Hodgkin şi Huxley numai prin analiza curenţilor ionici, aşa cum sînt: canalele ionice separate pentru fiecare din principalii ioni şi deplasările intramembranare de sarcină electrică, au fost ulterior confirmate experimental în mod direct.

După realizarea tehnicii potenţialului fixat şi pentru nodul Ranvier, de către B. Frankenhaeuser şi grupul său, în 1964 B. Frankenhaeuser şi A. F. Huxley au elaborat o descriere asemănătoare cu aceea din cazul axonului gigant şi pentru excitaţia la nivelul nodului Ranvier, ulterior apărînd astfel de descrieri şi pentru axonii de rac şi de crab, pentru fibrele Purkinje şi propunîndu-se o serie de variante. Se poate aprecia că odată cu elaborarea ecuaţiilor de tip Hodgkin — Huxley se încheie etapa studierii *fenomenologice* a impulsului nervos, accentul punîndu-se ulterior nu doar pe descrierea riguroasă în termeni electrochimici a generării şi propagării excitaţiei, ci pe înţelegerea fenomenelor de nivel subcelular care dau naştere şi se asociază cu manifestările electrice.

I.2.2. Studierea proceselor neelectrice asociate cu influxul nervos

Comparativ cu studierea bioelectricităţii, cercetările asupra corelaţiilor metabolice ale influxului nervos sînt de dată mult mai recentă *.

* Problemele energetice ale influxului nervos sînt tratate în capitolul IV.

Scanned with OKEN Scanner

În 1913, S. Tashiro a găsit că într-un nerv stimulat este crescută intensitatea producerii de bioxid de carbon, iar în 1917, tot el a arătat creşterea producerii de amoniac în urma stimulării. În 1927, W. Fenn a stabilit creşterea consumului de oxigen al nervului stimulat şi, în acelaşi an, R. W. Gerard a publicat un studiu cuprinzător asupra metabolismului nervului. Aceste cercetări se desfăşurau în perioada şi în contextul metabolismului energetic celular în general. Determinarea cu mare precizie a consumului de oxigen al nervului activ a fost posibilă după 1950, prin utilizarea metodei de tip polarografic a „electrodului de oxigen", aplicată la nerv în special de F. Brink, Jr. şi grupul său. Prin perfecţionarea acestei metode, J. M. Ritchie a reuşit să determine, în 1968, consumul de oxigen asociat cu propagarea unui singur impuls în nervul vag de iepure.

Încă din 1921, A. V. Hill a început studii de microcalorimetrie a nervului şi a continuat aceste cercetări împreună cu colaboratorii săi pe parcursul a peste patru decenii. În ultimele două decenii, B. C. Abbott, J. V. Howarth şi J. M. Ritchie au studiat în detaliu aspectul energetic al excitaţiei, urmărind modificările termice care apar la propagarea unui singur impuls.

După ce s-a stabilit că declanşarea şi propagarea excitaţiei sînt asociate cu fluxuri ionice de Na^+ şi K^+, avînd o cinetică destul de complicată, s-a trecut la căutarea „canalelor" prin care ionii traversează membrana axonală. Folosindu-se agenţi blocanţi specifici (§ III.4.1.), în special prin lucrările lui T. Narahashi şi B. Hille, s-a evidenţiat faptul că sodiul şi potasiul trec prin pori diferiţi şi s-au putut estima distribuţia şi caracteristicile electrice ale acestor pori.

Studierea modificărilor optice care însoţesc impulsul nervos fusese iniţiată încă din 1940 de F. O. Schmidt şi O. H. Schmidt, dar cu foarte puţin succes datorită insuficienţelor tehnicii. În jurul anului 1968, grupurile lui I. Tasaki, L. B. Cohen şi G. N. Berestovsky au pus în evidenţă modificări de birefringenţă, difuzia luminii şi fluorescenţă ce însoţesc impulsul nervos (subcapitolul III.5.), interpretîndu-le ca dovezi ale unor schimbări de conformaţie ale componenţilor membranei axonale. După 1973, C. M. Armstrong, F. Bezanilla, E. Rojas şi R. D. Keynes au putut măsura deplasările de sarcină electrică ce se produc în cadrul membranei axonale atunci cînd se deschid canalele ionice.

Din toate aceste cercetări, ca şi din numeroase altele menţionate în mod concret pe parcursul capitolelor II, III şi IV, se constituie o imagine din ce în ce mai aprofundată a proceselor elementare din care constă influxul nervos şi a modului în care sînt integrate aceste procese elementare într-o funcţie biologică de semnificaţie majoră.

I.3. RECEPŢIA ŞI TRANSMITEREA EXCITAŢIEI ÎNTRE CELULE

După cum este firesc şi rezultă şi din cele de mai sus, cunoştinţele şi concepţiile asupra modului în care sînt recepţionaţi stimulii de către organisme au evoluat paralel cu acelea despre excitabilitatea nervoasă în general. După anul 1800, pe măsură ce se cristaliza imaginea influxului nervos ca un proces bioelectric, s-a pus şi problema naturii concrete a interacţiunii dintre diferiţii stimuli şi formaţiunile receptoare, precum şi a modalităţilor prin care această interacţiune se transmite sistemului nervos central.

I.3.1. Funcţionarea receptorilor

Concepţia naivă după care fibrele nervoase sînt străbătute de corpusculi foarte subtili ce formează „copii" de diferite naturi (tactile, vizuale etc.) ale obiectelor înconjurătoare a persistat sub diferite forme pînă la începutul secolului al XIX-lea, fiind definitiv înlocuită numai de teoria *energiilor nervoase specifice*, formulată în 1826 de Johannes Müller (1801—1858). În esenţă, această teorie afirmă că fiecare organ de simţ dă un acelaşi tip de răspuns subiectiv, indiferent dacă este excitat de stimulul său natural obişnuit sau de un altul. Deşi formularea „energie nervoasă specifică" ne apare acum nepotrivită, fiindcă pare să sugereze că modalitatea de transmitere ar fi specifică prin fibrele nervoase ce inervează fiecare tip de receptor, meritul teoriei lui Müller constă în faptul de a fi anticipat şi subliniat că senzaţia subiectivă dată de excitarea unui grup de fibre nervoase este determinată de conexiunile centrale ale acestor fibre. C. S. Sherrington, la începutul acestui secol, a introdus conceptul de stimul adecvat, definindu-l drept acea formă de energie pentru care un anumit receptor are pragul minim de exci-

tare, adică prezintă sensibilitate diferenţială, şi a clasificat receptorii în funcţie de stimulii lor adecvaţi. Apoi, după 1920, E. D. Adrian şi Y. Zotterman au reuşit să înregistreze impulsurile nervoase de pe fibrele senzitive ce pleacă de la celule receptoare, putînd astfel să coreleze în mod direct stimulul aplicat cu răspunsul electrofiziologic. Prin studii de acest gen, care ulterior s-au făcut pe diferite sisteme neurosenzoriale, s-a stabilit în mod nemijlocit faptul că, indiferent de stimulul ce le-a produs, pe fibrele nervoase circulă impulsuri asemenea între ele, interacţiunea specifică fiind numai la nivelul celulelor receptoare. Un prim rezultat a fost înţelegerea bazei fiziologice a corelaţiei psihofizice dintre intensitatea stimulului fizic şi aceea a senzaţiei subiective. Această corelaţie a fost exprimată matematic în 1860 de Gustav Fechner (1801—1887) după ce Ernst Weber (1795—1878) investigase în detaliu sensibilitatea simţurilor şi stabilise că cea mai mică diferenţă discriminabilă între doi stimuli este o fracţiune constantă din amplitudinea stimulului respectiv.

În ceea ce priveşte interacţia propriu-zisă dintre stimuli şi celulele receptoare, natura proceselor primare este destul de puţin elucidată chiar pînă în prezent (capitolul IV). O excepţie remarcabilă o constituie receptorii vizuali, asupra funcţionării cărora avem o cunoaştere destul de detaliată (subcapitolul VI.6.). Încă în 1802, Thomas Young (1773—1829) a propus o teorie tricromatică a vederii colorate, bazîndu-se pe natura ondulatorie a luminii, iar în 1852, Helmholtz a dezvoltat această teorie dîndu-i forma care, în linii generale, este acceptată şi astăzi.

Tot Helmholtz a dezvoltat în 1863 teoria recepţiei auditive pe baza fenomenului de rezonanţă, reluînd în fond şi dezvoltînd o ipoteză formulată încă de Albrecht von Haller (1708—1777). Teoria rezonanţei consideră că membrana bazilară (din urechea internă) se comportă ca un ansamblu de rezonatori cuplaţi, fiecare porţiune fiind acordată pentru o anumită frecvenţă. Mulţi ani mai tîrziu, în deceniul al 5-lea al secolului nostru, Georg von Békésy a dovedit că membrana bazilară nu este acordată local pentru diferite frecvenţe, ci că se propagă o undă de deformare ce are maximul localizat într-o anumită zonă; deci, Békésy a înlocuit rezonanţa în regim static cu rezonanţa în regim dinamic.

Apare evident faptul că modalităţile senzoriale fundamentale — văzul şi auzul — s-au bucurat de o atenţie deose-

bită din partea fiziologilor şi studiul lor s-a dezvoltat în strînsă legătură cu domeniile corespunzătoare ale fizicii, optica şi acustica. Studierea recepţiei celorlalţi stimuli a fost abordată în manieră biofizică numai mult mai tîrziu, atunci cînd metodele microelectrofiziologice au devenit suficient de perfecţionate pentru a permite lucrul cu celule receptoare unice, izolate împreună cu fibra nervoasă aferentă şi asupra cărora să se aplice stimuli riguros controlaţi. În jurul anului 1955, L. M. Beidler şi V. G. Dethier au studiat chemorecepţia gustativă, primul la vertebrate iar celălalt la insecte. Beidler a propus atunci o teorie a stimulării receptorilor gustativi, bazată pe adsorbţia substanţelor pe locuri critice de pe membrana celulei receptoare. În aceeaşi perioadă, W. R. Loewenstein a studiat generarea excitaţiei în mecanoreceptori, şi anume în corpusculii Pacini, cu precizie şi în suficient detaliu pentru a putea identifica secvenţa de procese dintre aplicarea stimulului şi apariţia impulsurilor pe fibra nervoasă. Asupra etapelor mai recente ale studierii recepţiei vizuale nu mai insistăm, ele fiind analizate în subcapitolul VI.6. Încheiem această prezentare menţionînd că un bilanţ foarte cuprinzător al achiziţiilor dobîndite pînă în 1965 în descifrarea funcţionării receptorilor este cuprins în vol. 30 din *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitatiave Biology*.

I.3.2. Transmiterea excitaţiei între celule

Modul în care este concepută transmiterea excitaţiei în cadrul sistemului nervos, şi de la acesta la elementele efectoare este direct condiţionat de imaginea pe care o acceptăm referitor la structura microscopică a sistemului nervos. Pînă la începutul acestui secol, inclusiv în primele sale decenii, o serie de histologi în frunte cu Hans Held au susţinut că întregul sistem nervos reprezintă o uriaşă unitate sinciţială—neurenciţiul. În opoziţie cu aceştia s-a constituit *teoria neuronală* ale cărei baze au fost puse de Wilhelm His (1831—1904) şi August Forel (1848—1931) şi la a cărei afirmare a contribuit din plin şi Gheorghe Marinescu (1863—1938). În esenţă, teoria neuronală afirmă că sistemul nervos este alcătuit din neuroni, care sînt celule distincte, complet delimitate prin membrane plasmatice, fiecare neuron fiind o unitate morfofuncţională, cu dinamică trofico-metabolică şi funcţională proprie, dar aflată în strînsă interdependenţă

cu numeroase alte unităţi asemenea. După 1880, Santiago Ramon y Cajal (1852—1934) a stabilit în mod cert faptul că între neuroni, ca şi între aceştia şi celulele efectoare pe care le inervează, deşi este un contact foarte strîns, sînt treceri prin zone de *contiguitate*. În 1897, C. S. Sherrington a denumit aceste zone *sinapse*, termenul însemnînd în limba greacă „închidere" sau „strîngere".

Alternativa între continuitate şi contiguitate structurală sugerează, în ceea ce priveşte transmiterea excitaţiei, fie funcţionarea aceluiaşi tip de mecanism prin care se propagă influxul în fibrele nervoase, fie existenţa unor mecanisme specifice. Încă în 1857, Claude Bernard (1813—1878) a arătat că o otravă puternic paralizantă cum este curara (amestec de alcaloizi naturali) blochează trecerea influxului nervos prin joncţiunea dintre nerv şi muşchi, neafectînd însă nici conducerea impulsurilor în nerv şi nici capacitatea muşchiului de a se contracta ca răspuns la un stimul electric aplicat direct pe el. Concluzia care se impune imediat este că acţiunea curarei se manifestă asupra unor factori chimici ce operează la joncţiunea neuromusculară. În 1874, DuBois-Reymond a formulat în mod explicit alternativa dintre transmisia chimică şi cea electrică, prevăzînd faptul că nervii pot să comunice cu elementele efectoare atît prin transmisie electrică directă, cît şi prin intermediul unor substanţe eliberate de terminaţiile nervoase. El presupunea că aceste substanţe ar fi amoniacul şi acidul lactic.

Concepţia transmisiei neuromusculare prin mediatori chimici a fost puternic sprijinită de descoperirea faptului că numeroase substanţe, atît naturale cît şi sintetice, sînt capabile să mimeze efectul impulsurilor nervoase atunci cînd sînt fie injectate în sînge, fie aplicate local la nivelul joncţiunii. Astfel, în 1909, J. N. Langley a arătat că nicotina stimulează regiunea plăcilor motorii ale muşchilor, chiar atunci cînd s-a produs degenerescenţa terminaţiilor nervoase în urma secţionării nervului şi că acţiunea stimulatorie a nicotinei este blocată de curara proporţional cu concentraţiile relative ale celor două substanţe. El a ajuns astfel la conceptul de *receptori* situaţi pe membrana postjoncţională şi care au rolul de a interacţiona cu mediatorul chimic.

În 1921, O. Loewi a demonstrat în mod direct şi convingător transmisia chimică de la nervul vag parasimpatic (a cărui stimulare reduce amplitudinea şi frecvenţa bătăilor inimii) către muşchiul cardiac, arătînd că în lichidul de per-

fuzie a apărut, în urma stimulării nervului, o substanţă capabilă să inhibe direct o altă inimă. Respectiva substanţă vagală s-a dovedit a fi acetilcolina, pe care H. Dale şi colaboratorii săi au identificat-o după 1936 şi drept mediator chimic între nervii motori şi muşchii striaţi. În 1938, mai mulţi cercetători au constatat că primul biopotenţial ce poate fi înregistrat în zona plăcii motorii în urma stimulării nervului nu este potenţialul de acţiune al fibrelor musculare, ci o variaţie locală şi nepropagabilă de potenţial, indusă de mediatorul chimic. În 1950, P. Fatt şi B. Katz au observat că şi în repaus se pot înregistra potenţiale locale mici apărute spontan şi a căror amplitudine este multiplul unei anumite valori. Corelarea acestor observaţii cu imaginile de microscopie electronică (E. De Robertis) ce arată prezenţa în terminaţiile axonale presinaptice a unor vezicule a dus la formularea teoriei eliberării cuantificate de mediator chimic (§ V.2.4.). Această teorie explică apariţia depolarizării locale a plăcii motorii prin spargerea simultană a unui număr de vezicule cu mediator chimic proporţional cu frecvenţa impulsurilor nervoase. În stare de repaus au loc spargeri spontane de vezicule, ceea ce dă naştere potenţialelor miniaturale observate de Fatt şi Katz. După 1965, studiile lui B. Katz şi R. Miledi şi ale altor numeroşi cercetători vizează caracterizarea proceselor ce au loc în membrana postsinaptică sub influenţa mediatorului chimic, detaliind descrierea făcută de J. C. Eccles asupra mecanismelor ionice de apariţie a potenţialelor locale şi propagate, pînă la caracterizarea canalelor ionice din membrana postsinaptică (§ V.3.1.). În paralel cu aceasta, grupurile lui E. De Robertis şi J.-P. Changeux studiază din punct de vedere chimic şi structural moleculele cu rol de receptor de pe membranele postsinaptice, iar cercetările de farmacologie urmăresc evidenţierea diferitelor substanţe cu rol de mediator chimic în sistemul nervos central.

După 1960, a fost dovedită în mod cert existenţa şi a unei transmisii electrice directe între celulele excitabile, M. V. L. Bennett explicitînd, în jurul anului 1970, cerinţele fiziologice cărora transmisia electrică le corespunde în mod optim: viteză mare de transmitere şi activitate electrică sincronă a mai multor celule.

* * *

Toate procesele de care se ocupă neurobiofizica, şi anume: generarea excitaţiei în celulele receptoare specializate şi în

fibrele nervoase, propagarea impulsului nervos şi transmiterea excitaţiei între celule, se desfăşoară în special la nivelul membranelor celulare. Imaginea dinamică a structurii membranelor, acreditată după 1971 prin conceperea lor ca „mozaicuri fluide" de lipide şi proteine în conformaţie globulară, permite corelarea în mod raţional a proceselor menţionate, cu tranziţii moleculare ale componenţilor membranari.

BIBLIOGRAFIE

Sursele bibliografice menţionate mai jos au fost folosite numai pentru perioada anterioară anului 1920. Evoluţia ulterioară a cercetărilor a fost trasată pe baza consultării directe sau indirecte a lucrărilor autorilor menţionaţi în text.

BRAZIER, M. (1959), în *Handbook of Physiology*, Section 1, vol. I, American Physiological Society, Washington D.C.

LEAKE, CH. D. (ed.) (1956), *Some Founders of Physiology*, IUPS & American Physiological Society, Washington D.C.

MARX, CH. (1963), în *Physiologie*, Ch. Kayser (ed.), vol. II, Flammarion, Paris.

SHEER, D. E. (1961), în *Electrical Stimulation of the Brain*, D.E. Sheer (ed.), Univ. of Texas Press, Austin, Texas.

VOICULESCU, V., şi colab. (1963), *Din istoria cunoaşterii creierului*, Editura Ştiinţifică, Bucureşti, cap. 1—3 şi 6.

CAPITOLUL II

MEMBRANELE ŞI ROLUL LOR ÎN FUNCŢIONAREA CELULELOR EXCITABILE

Una dintre cele mai evidente achiziţii ale biologiei celulare a ultimelor decenii este înţelegerea faptului că orice celulă vie îşi poate desfăşura viaţa numai în condiţiile unei reglări stricte a schimburilor de substanţe cu exteriorul şi a unei distribuţii intracelulare specifice a diferiţilor componenţi. Existenţa membranelor biologice ca limite de separaţie între compartimente distincte şi funcţionarea acestor membrane nu ca simple bariere inerte, ci ca elemente active, dotate cu echipamentul molecular necesar unor utilizări specifice a energiei metabolice pot fi considerate certitudini de la care se porneşte în explicarea a foarte numeroase funcţii celulare. Posibilităţile oferite de microscopia electronică de a vizualiza ultrastructurile celulare şi în particular membranele, împreună cu utilizarea largă a izotopilor radioactivi pentru măsurarea fluxurilor de substanţe şi cu perfecţionarea tehnicilor de înregistrare a parametrilor electrici celulari, au făcut ca studierea fenomenelor de membrană să reprezinte unul din capitolele majore, poate chiar cel mai important, din biofizica contemporană.

Atributul celulelor nervoase şi în general al oricărei celule excitabile de a răspunde la stimuli externi printr-o activitate electrică proprie şi specifică derivă în mod nemijlocit din *funcţionarea membranelor excitabile*. Aceste membrane, în afara rolului lor general de a regla schimburile de substanţe cu exteriorul, au şi proprietatea ca, sub influenţa stimulilor externi, să sufere variaţii tranzitorii şi propagabile de permeabilitate care constituie baza activităţii electrice a celulelor excitabile. Au mai existat şi alte concepţii referitoare la excitabilitate, în care rolul major nu este atribuit membranelor, cele mai proeminente dintre acestea fiind teoria „sorbţiei" (Troshin, 1956) şi teoria „asociaţiei şi a inducerii"

CAPITOLUL II

MEMBRANELE ŞI ROLUL LOR ÎN FUNCŢIONAREA CELULELOR EXCITABILE

Una dintre cele mai evidente achiziţii ale biologiei celulare a ultimelor decenii este înţelegerea faptului că orice celulă vie îşi poate desfăşura viaţa numai în condiţiile unei reglări stricte a schimburilor de substanţe cu exteriorul şi a unei distribuţii intracelulare specifice a diferiţilor componenţi. Existenţa membranelor biologice ca limite de separaţie între compartimente distincte şi funcţionarea acestor membrane nu ca simple bariere inerte, ci ca elemente active, dotate cu echipamentul molecular necesar unor utilizări specifice a energiei metabolice pot fi considerate certitudini de la care se porneşte în explicarea a foarte numeroase funcţii celulare. Posibilităţile oferite de microscopia electronică de a vizualiza ultrastructurile celulare şi în particular membranele, împreună cu utilizarea largă a izotopilor radioactivi pentru măsurarea fluxurilor de substanţe şi cu perfecţionarea tehnicilor de înregistrare a parametrilor electrici celulari, au făcut ca studierea fenomenelor de membrană să reprezinte unul din capitolele majore, poate chiar cel mai important, din biofizica contemporană.

Atributul celulelor nervoase şi în general al oricărei celule excitabile de a răspunde la stimuli externi printr-o activitate electrică proprie şi specifică derivă în mod nemijlocit din *funcţionarea membranelor excitabile*. Aceste membrane, în afara rolului lor general de a regla schimburile de substanţe cu exteriorul, au şi proprietatea ca, sub influenţa stimulilor externi, să sufere variaţii tranzitorii şi propagabile de permeabilitate care constituie baza activităţii electrice a celulelor excitabile. Au mai existat şi alte concepţii referitoare la excitabilitate, în care rolul major nu este atribuit membranelor, cele mai proeminente dintre acestea fiind teoria „sorbţiei" (Troshin, 1956) şi teoria „asociaţiei şi a inducerii"

(Ling, 1962), acestea nereuşind însă a căpăta mai mult decît statutul de ipoteze cu o acceptare foarte restrînsă şi aflate în afara cursului principal al cercetărilor actuale.

Raportarea la procese ce au loc la nivelul membranelor va constitui pe tot parcursul acestei lucrări principalul element unificator în tratarea diferitelor aspecte ale funcţionării neuronilor şi a celulelor neuronale specializate. Trebuie spus în mod explicit că cel mai profund nivel de înţelegere a fenomenelor ce au loc în sistemul nervos, accesibil în stadiul actual de dezvoltare a ştiinţei, constă cu precădere din stabilirea corelaţiilor dintre evidenţele electrofiziologice şi procesele de membrană care le dau naştere. Datorită acestui fapt, în cele ce urmează vom prezenta unele aspecte cu caracter general ale membranelor biologice, particularizîndu-le apoi pentru cazul membranelor excitabile.

II.1. STRUCTURA MEMBRANELOR BIOLOGICE

Membranele sînt formaţiuni flexibile, ce pot fi separate de citoplasmă ca entităţi distincte, deşi au grosimea de numai 60—100 Å, echivalînd aproximativ cu două lungimi de moleculă lipidică. În membranele izolate se găsesc mai ales lipide şi proteine, în proporţii variabile, dar în jur de 50% fiecare. În celulele animale o mare parte din lipidele membranare sînt fosfolipide.

Secţiunile prin membrane se prezintă în preparatele de microscopie electronică ca două benzi întunecate, cu grosimea de cîte 25 Å, separate printr-o regiune centrală mai transparentă, cu grosimea de aproximativ 35 Å (fig. II.1.a.). Zonele electronopace corespund grupărilor hidrofile, iar zona electronotransparentă corespunde grupărilor hidrofobe. Capacitatea electrică a membranelor celulare prezintă o constanţă remarcabilă de la o celulă la alta, în toate cazurile avînd valori în jur de 1 $\mu F/cm^2$ (Cole, 1968).

Deoarece pînă în prezent nu există vreo metodă prin care să poată fi vizualizată în mod direct dispunerea moleculelor lipidice şi proteice în membrane, se folosesc date experimentale indirecte pe baza cărora sînt elaborate *modele* ale arhitecturii moleculare a membranelor.

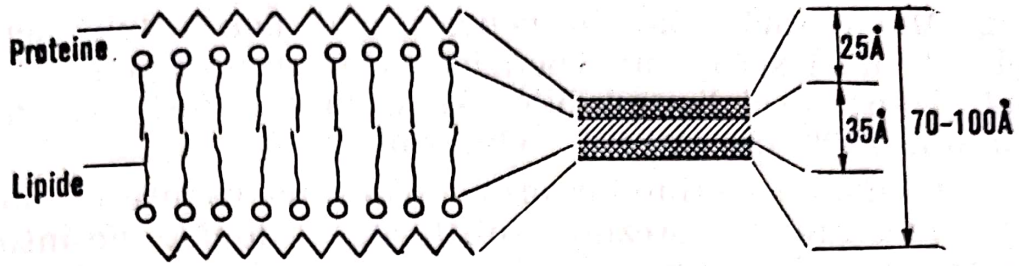


Fig. II.1. : Modelul Danielli-Davson de structură a membranei celulare şi corespondenţa cu aspectul trilaminar al membranelor în preparatele de microscopie electronică. Zona electronotransparentă centrală corespunde porţiunii hidrofobe a lipidelor, iar benzile electronopace corespund zonelor polare.

II.1.1. Modele ale structurii membranelor biologice

Principalele modele de structură ale membranelor sînt: modelul „stratului dublu lipidic" (elaborat de J. F. Danielli şi H. Davson), modelul „cu subunităţi" (dezvoltat mai ales de D. Green şi colaboratorii săi) şi modelul „mozaic fluid de lipide şi proteine globulare" (elaborat de S. Singer şi G. Nicolson). Aceste modele caută să explice structura membranelor biologice pe baza interacţiilor lipid-lipid, proteină-proteină şi lipid-proteină în mediu apos, deoarece lipidele şi proteinele sînt componentele de bază ale membranelor biologice.

În 1952, E. Gorter şi F. Grendel au arătat că membranele celulare sînt alcătuite dintr-un strat dublu de molecule lipidice suprapuse. Ei au ajuns la această concluzie extrăgînd cu acetonă lipidele din hematii şi comparînd suprafaţa ocupată de un strat monomolecular din aceste lipide cu suprafaţa totală a hematiilor din care au fost extrase. Deoarece lipidele extrase şi întinse în strat monomolecular ocupă o suprafaţă dublă faţă de aceea a membranelor din care provin, rezultă că în membrană ele sînt dispuse într-un strat dublu. După 1935, Danielli şi Davson au propus şi dezvoltat un model de membrană celulară constînd din două straturi de molecule lipidice cu capetele polare spre exterior, avînd pe ambele feţe adsorbite proteine (fig. II.1.b.).

Modelul Danielli-Davson este susţinut mai ales de următoarele dovezi experimentale (Stoeckenius şi Engelman, 1969):

1) Analizele chimice ale membranelor izolate arată că acestea sînt alcătuite în principal din lipide şi proteine în raporturi compatibile cu modelul.

2) Membranele sînt în general mai permeabile pentru molecule mici şi care au coeficient ridicat de partiţie între lipid şi apă, deci liposolubile. Acest fapt a fost evidenţiat încă din 1899 de către E. Overton.

3) Imaginile secţiunilor prin membrană văzute la microscopul electronic se prezintă sub forma a două zone întunecate separate de o zonă mai clară. În acelaşi mod se prezintă şi membranele artificiale formate în apă din lipide şi proteine extrase din membranele celulare.

4) Măsurătorile de impedanţă a suspensiilor de celule şi de organite izolate sînt compatibile cu presupunerea că ele sînt înconjurate de un strat continuu de hidrocarburi cu aceeaşi grosime ca în straturile duble fosfolipidice.

5) Lipidele izolate din membranele naturale şi dispersate în apă tind să formeze straturi duble, aceasta fiind configuraţia cu energia internă cea mai scăzută, deci cea mai stabilă. Diverşi parametri fizici ai acestor straturi duble (capacitatea electrică, permeabilitatea pentru apă şi diferiţi solviţi, tensiunea superficială) sînt foarte asemănători cu cei ai membranelor naturale.

6) Straturile duble lipidice aflate în mediu apos interacţionează cu proteinele adăugate în acest mediu, păstrîndu-şi structura lamelară şi căpătînd un aspect ce nu poate fi distins la microscopul electronic de cel al membranelor naturale.

Există şi obiecţii împotriva modelului Danielli-Davson, bazate tot pe date experimentale: adesea structura membranelor celulare nu apare la microscopul electronic sub forma a trei zone continue, ci apar şiruri de granule mai mult sau mai puţin ordonate, iar pe de altă parte la microscopul electronic apar sub forma a trei zone continue şi unele structuri care, datorită compoziţiei lor chimice, în mod evident nu pot fi de forma modelului. Aşa este cazul peretelui celular extern al bacteriilor.

Modelului original al lui Danielli i s-au adus unele modificări pentru a-l face să corespundă diferitelor observaţii experimentale. Astfel, pentru a explica permeabilitatea destul de ridicată a membranelor celulare pentru ioni, s-a presupus existenţa unor pori polari umpluţi cu apă.

De asemenea, deoarece cele două feţe ale membranei sînt foarte diferite din punct de vedere funcţional, s-au

propus modele în care nu mai este o simetrie structurală, ci pe una din feţe sînt adsorbite şi proteine globulare ce ar putea fi implicate, de exemplu, în transportul activ sau în procesele de recunoaştere de tipul interacţiei antigen-anticorp.

Faptul că în structura virusurilor şi a moleculelor proteice mari (hemoglobina, mioglobina etc.) au fost identificate subunităţi care se repetă a determinat încercarea de a reprezenta şi membranele biologice ca fiind formate din subunităţi asemenea între ele. Avantajul unei astfel de ipoteze este că formarea membranelor prin asamblarea unor subunităţi asemenea ar necesita o cantitate de informaţie genetică mai mică, iar anumite funcţii pot fi explicate prin procesele cooperative ce ar putea să aibă loc într-un astfel de ansamblu de subunităţi.

Obiecţiile esenţiale împotriva modelului cu subunităţi sînt: a) în cursul preparărilor pentru microscopia electronică (şi anume a uscării) pot apărea artefacte, deci formaţiunile micelare observate pe această cale nu pot fi considerate probatorii decît dacă sînt relevate şi prin alte mijloace; b) vitezele de reînnoire metabolică (*turnover*) ale lipidelor şi ale proteinelor membranare sînt diferite, ceea ce pune sub semnul întrebării posibilitatea existenţei unor entităţi lipoproteice.

O mare parte din limitările şi deficienţele celor două modele menţionate anterior au fost depăşite prin elaborarea de către S. Singer şi G. Nicolson (1972) (Singer, 1974) a unui model de membrană, în cadrul căruia pot fi regăsite cîte unele din caracteristicile fiecăruia din cele două modele. Aceşti autori presupun că membranele celulare sînt formate dintr-un strat dublu de lipide, în care sînt împlîntate din loc în loc diferite proteine globulare (fig. II.2.), ce se pot mişca în cadrul matricei lipidice, formînd astfel un „mozaic fluid" de lipide şi proteine globulare. Termenul „fluid" arată că sînt posibile deplasări ale moleculelor în planul membranei, din punctul de vedere al stării fizice membranele biologice comportîndu-se ca nişte cristale lichide. Proteinele globulare pot fi doar adsorbite la suprafaţa stratului lipidic, în care caz ele sînt proteine „periferice" sau „extrinseci", relativ uşor detaşabile de stratul lipidic, sau pot pătrunde

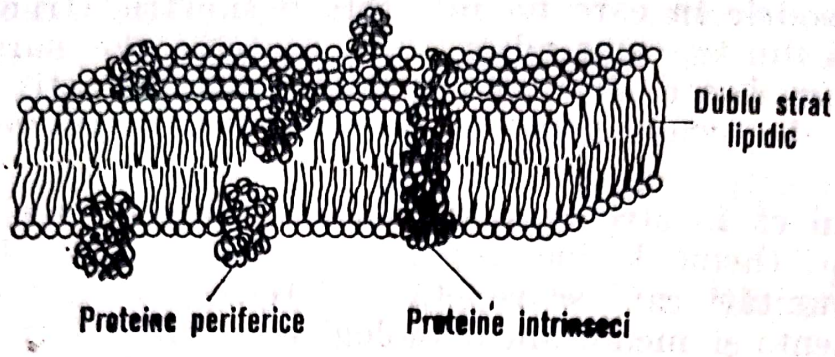


Fig. II.2. : Modelul membranei celulare ca mozaic fluid de proteine în conformaţie globulară aflate într-o matrice lipidică.

în acest strat la diferite adîncimi, chiar străbătîndu-l, în acest caz fiind proteine „integrale" sau „intrinseci", ce nu pot fi extrase din membrană fără a o leza în mod ireversibil.

Proteinele globulare pot fi, de exemplu, sisteme enzimatice implicate în transportul diferitor substanţe hidrofile ce nu pot trece prin porţiunea lipidică a membranei, în acest fel putîndu-se explica faptul că membranele au permeabilitate mare pentru ioni.

Dacă în cadrul „mozaicului" membranar proteinele integrale sînt dispuse periodic, la microscopul electronic vor putea apărea subunităţi cvasiidentice, care se repetă. Dealtfel, asemenea imagini cu subunităţi apar în modul cel mai evident în cazul mitocondriilor, cloroplastelor şi al discurilor interne din bastonaşele fotoreceptorilor, acolo unde funcţia biologică respectivă impune o dispunere regulată în matricea lipidică a proteinelor funcţionale.

Toate argumentele citate anterior în sprijinul modelului Danielli-Davson îşi păstrează aplicabilitatea şi în cazul „mozaicului" de lipide şi proteine globulare, un argument esenţial în favoarea acestui model fiind şi faptul că această distribuţie a lipidelor şi proteinelor este cea mai stabilă din punct de vedere energetic, deoarece permite o separare optimă a grupărilor polare (hidrofile) de cele nepolare (hidrofobe), atît ale lipidelor cît şi ale proteinelor, căci şi unele şi altele conţin ambele tipuri de grupări.

Permiţînd explicarea, cel puţin calitativă, a majorităţii proceselor de membrană, modelul „în mozaic" se bucură deja de o recunoaştere foarte largă.

II.1.2. Filmele lipidice bimoleculare

Un auxiliar a cărui utilitate în cercetările asupra membranelor biologice a fost şi este mereu confirmată îl reprezintă *filmele lipidice bimoleculare* formate în mediu apos din lipide extrase din celule. Importanţa cu totul deosebită a acestor membrane artificiale, introduse în cercetarea biofizică de Mueller şi colab. (1962), decurge din marea lor asemănare structurală cu membranele celulare. Formarea unui film lipidic bimolecular constă în esenţă din următoarele: se extrag — cu amestec de cloroform şi metanol — lipidele celulare, de obicei din substanţa albă din creier, foarte bogată în lipidele ce formează mielina, şi se depune cu o pensulă o picătură din soluţia de lipide pe un mic orificiu într-un perete din material plastic inert (teflon, polietilenă) scufundat într-o soluţie apoasă de compoziţie salină asemănătoare cu cea a plasmei. Datorită interacţiilor moleculare care fac ca grupările polare ale lipidelor să fie în contact cît mai întins cu apa, iar lanţurile hidrocarburice hidrofobe să nu fie în contact cu apa, stratul de lipide depus pe orificiu se subţiază *spontan* (excesul de lipide strîngîndu-se ca picături), pînă cînd rămîn numai două straturi de molecule lipidice ale căror lanţuri hidrofobe se atrag între ele prin forţe van der Waals. Formarea filmului bimolecular este dovedită prin schimbarea imaginii de interferenţă a unui fascicul de lumină reflectat de către stratul de lipide. Atunci cînd a ajuns bimolecular, stratul lipidic reflectă foarte puţin lumina, imaginea de interferenţă fiind foarte întunecată.

Dacă un astfel de film lipidic bimolecular separă două compartimente apoase (fig. II.3.), pot fi studiate proprietăţile sale electrice în funcţie atît de compoziţia sa cît şi

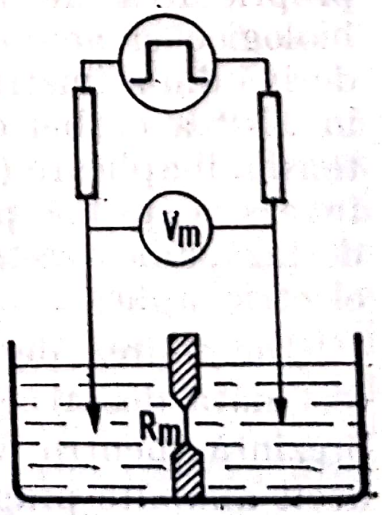


Fig. II.3. : Schema de principiu a măsurării parametrilor electrici ai unei membrane lipidice formată ca strat bimolecular între două soluţii apoase. De la un generator se aplică variaţii de potenţial în trepte, prin intermediul unor rezistenţe externe. Tensiunea efectivă pe rezistenţa R_m a membranei este V_m.

de a celor două soluţii. În toate cazurile, grosimea straturilor lipidice bimoleculare este apropiată de aceea a membranelor celulare, fiind în jur de 75 Å, iar capacitatea lor electrică — între 0,4 şi 1,2 $\mu F/cm^2$, depinzînd de natura lipidelor — este, de asemenea, practic identică cu aceea a membranelor celulare (Mueller şi colab., 1962; Hanai şi colab., 1965). Şi alte proprietăţi, enumerate în paragraful precedent, sînt foarte apropiate de cele ale membranelor naturale, însă rezistenţa electrică a straturilor lipidice este de 10^5—10^7 × mai mare decît a majorităţii membranelor celulare.

O descoperire de mare importanţă a fost aceea că există o serie de substanţe care, atunci cînd sînt dizolvate în soluţiile apoase adiacente filmelor lipidice bimoleculare, se adsorb pe acestea şi fac ca rezistenţa electrică să scadă pînă la valorile obişnuite pentru membranele celulare. Astfel de substanţe sînt unii detergenţi, unele antibiotice macrociclice şi un compus proteic extras din *Enterobacter cloacae*, numit „material care induce excitabilitatea" (prescurtat EIM) (Mueller şi Rudin, 1963). Acest material este capabil să formeze în membranele lipidice canale bune conducătoare pentru cationi care au proprietăţi electrocinetice asemănătoare cu cele ale canalelor din membrana axonală. O analiză teoretică detaliată a transportului de ioni de către astfel de compuşi a fost făcută de Markin şi Cizmadjev (1974).

Dacă se trasează dependenţa curentului prin membranele bimoleculare cu EIM în funcţie de valoarea diferenţei de potenţial aplicată între cele două compartimente, se obţine o reprezentare ca în fig. II.4. Faptul că valorile curentului în cele două sensuri nu sînt egale pentru aceeaşi tensiune aplicată, de exemplu pentru plus şi minus 20 mV, constituie proprietatea de *rectificare*, comună tuturor membranelor biologice şi acestor membrane artificiale, proprietate care derivă din asimetria structurii interne a membranelor. Forma în „N" a curbei curent-tensiune pentru anumite valori ale tensiunii aplicate (peste 60 mV într-un sens şi 30 mV în sens invers) exprimă producerea în membrană a unor tranziţii de fază, adică restructurări moleculare sub influenţa cîmpului electric aplicat.

Denumirea de „materiale care induc excitabilitatea" a fost dată deoarece membranele lipidice care le-au adiţionat prezintă, pentru valori ale potenţialului aplicat mai mari decît anumite praguri, scăderi bruşte şi reversibile ale rezis-

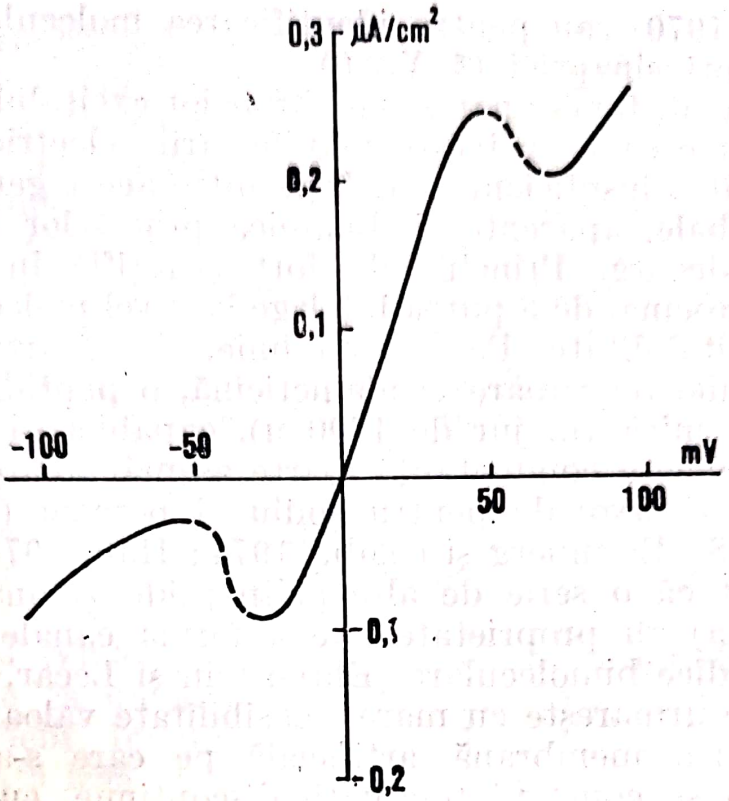


Fig. II.4. : (după Mueller și Rudin, 1968) : Dependența dintre curent și tensiunea aplicată pentru o membrană lipidică pe care s-au adsorbit substanțe „inductoare de excitabilitate". Se observă asimetria curbei, deci proprietățile de rectificare, și zonele de instabilitate, trasate întrerupt.

tenței, analoage scăderilor tranzitorii de rezistență ale membranelor celulelor excitabile stimulate.

Membranele lipidice bimoleculare au devenit principala modalitate de a testa diferiți componenți proteici extrași din membrane biologice, și despre care se presupune că reprezintă sau cel puțin fac parte din „canalele" ionice existente în acele membrane. În principiu, această testare constă din extragerea selectivă și purificarea diferiților componenți membranari care apoi sînt adsorbiți pe o membrană lipidică și se urmărește dacă modificările de conductanță pe care le induc asupra acesteia au aceleași caracteristici cinetice și aceleași sensibilități farmacologice (adică sînt influențate la fel de diferite substanțe) ca și canalele ionice din membranele excitabile din care au fost extrași respectivii componenți. Astfel de studii se fac nu numai în legătură cu componenții membranelor axonale (§ II.1.4), ci și cu cei ai altor celule excitabile, cum ar fi alga *Nitella* (Alecsandrov

şi colab., 1970) sau pentru identificarea moleculelor cu rol de receptori sinaptici (§ V.2.6).

În prezent, funcţionarea membranelor excitabile este bine descrisă în ceea ce priveşte manifestările electrice, dar nu există decît o insuficientă corelaţie între acest gen de manifestări globale, aparente şi dinamica proceselor moleculare din care decurg. Principalul efort ştiinţific în neurobiofizică este tocmai de a putea înţelege la nivel molecular funcţia de excitabilitate. Pe această linie, sînt foarte promiţătoare studiile referitoare la alameticină, o peptidă cu masa moleculară mică (în jur de 1700 u), capabilă să inducă în filmele lipidice o conductanţă foarte asemănătoare cu aceea a membranei axonale pentru sodiu şi potasiu (Mueller şi Rudin, 1968; Eisenberg şi colab., 1974; Hall, 1975). Recent s-a dovedit că o serie de alte polipeptide (monazomicina, suzukacilina) au proprietatea de a forma canale ionice în filmele lipidice bimoleculare (Ehrenstein şi Lecar, 1977).

Dacă se urmăreşte cu mare sensibilitate valoarea curentului printr-o membrană artificială pe care s-a adsorbit alameticină se constată fluctuaţii discontinue, cuantificate, care reflectă formarea în membrană a unor entităţi echivalente cu canalele ionice, a căror deschidere dă salturile discontinue de conductanţă de ordinul a $10^{-9}\ \Omega^{-1}$. Moleculele de alameticină adsorbite pe suprafaţa membranei lipidice se agregă ca micele pe care cîmpul electric aplicat le include în membrană, iar acolo suferă fluctuaţii între cîteva conformaţii posibile, fiecărei conformaţii corespunzîndu-i o anumită conductanţă, în sensul că o configuraţie mai deschisă a ansamblului de molecule de alameticină ce formează micela va corespunde unei conductanţe ionice mai mari.

II.1.3. Ionofori şi canale ionice

În legătură cu procesele de traversare a membranelor celulare de către ioni, apar două concepte — *ionofori* şi *canale ionice* — a căror folosire a fost mult timp ambiguă sau între care se optează uneori fără o justificare adecvată.

Faptul că matricea membranelor celulare este lipidică, deci hidrofobă, face ca trecerea continuă a unor molecule hidrofile, aşa cum sînt ionii (Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+} etc.) să nu poată fi explicată decît admiţînd că în membrană există din loc în loc zone hidrofile. Aceste zone hidrofile pot fi

concepute fie ca niște pori ce traversează membrana dintr-o parte în alta, avînd eventual o geometrie asimetrică și variabilă în timp, fie ca niște molecule cu porțiuni hidrofile în care pot fi incluși ioni, a căror trecere prin membrană să se facă numai odată cu translocarea respectivei molecule purtătoare. Corespunzător cu fiecare din aceste două imagini este conceptul de canal ionic și, respectiv, acela de ionofor, fiind evident că prin considerarea canalelor ionice se subliniază aspectul structural, iar prin ionofori se pune accentul pe interacțiile moleculare implicate de trecerea ionilor prin membrane. Principala cerință pentru fiecare din aceste două imagini este de a putea explica selectivitatea membranelor biologice, adică modul prin care pot fi discriminați ioni care uneori au proprietăți chimice practic identice, cum ar fi Na^+ și K^+.

Eigen și Winkler (1970) au enumerat proprietățile necesare pentru ca un ionofor pentru ionii metalici să fie specific și eficient. Ionoforul trebuie să aibă grupări electrofile care să poată lega ionul metalic în mod competitiv cu interacția acestuia cu moleculele de solvent. El trebuie ca în molecula sa să aibă o „cavitate" cu dimensiuni strict adaptate în raport cu cele ale ionului. Ionoforul trebuie, de asemenea, să fie caracterizat de o flexibilitate conformațională suficient de mare pentru a fi posibilă legarea și descărcarea rapidă a ionului, cu constante de timp care să poată explica fluxurile ionice prin membrană.

Studiile cu filme lipidice bimoleculare pe care s-au adsorbit diferite antibiotice au arătat existența reală și caracteristicile fiecăruia din cele două tipuri de transport al ionilor prin membrane. Astfel, valinomicina formează complexe cu ionii alcalini avînd specificitate ridicată pentru potasiu. O singură moleculă de valinomicină (acționînd ca ionofor sau transportor) poate vehicula printr-o membrană lipidică pînă la 10^4 ioni K^+ pe secundă (Benz și colab., 1973). Un alt antibiotic, gramicidina A, se inseră în filmele lipidice ca o structură elicoidală cu un canal hidrofilic central, cu diametrul de 4 Å. Printr-un astfel de canal pot trece 2×10^7 ioni Na^+ pe secundă (Hladky și Haydon, 1972), ceea ce confirmă că porii sau canalele ionice au o capacitate de transport cu cîteva ordine de mărime superioară față de cea a ionoforilor. Sînt în curs de elaborare descrieri ale proprietăților electrice și de selectivitate ale canalelor de gramicidină A (Sandblom și colab., 1977).

În cazul membranelor excitabile, posibilitatea ca ionii să traverseze membrana prin solubilizare, combinaţi cu molecule transportoare specifice (ionoforii) apare ca adecvată pentru explicarea transportului activ, în care sînt implicate fluxuri de ordinul a numai 10 ioni/s prin fiecare loc de pompaj, dar total nepotrivită pentru explicarea fluxurilor pasive foarte ample (4×10^8 ioni Na^+/s) care traversează membrana în timpul excitaţiei. Aceste fluxuri au loc prin pori hidrofili (Armstrong, 1975; Mullins, 1975) care constituie canale ionice ale căror selectivitate şi distribuţie în membranele axonale sînt discutate în capitolul III.

Măsurînd permeabilitatea membranei axonului gigant de calmar pentru apă şi diferiţi neelectroliţi, Villegas şi colab. (1968) au ajuns la concluzia că în această membrană sînt pori cu diametrul de 4—5 Å, distanţaţi la aproximativ 0,1 μm unul de altul. O parte din aceşti pori ar putea servi drept canale ionice prin care sodiul să pătrundă, iar potasiul să iasă din axoplasmă în timpul excitaţiei, utilizarea specifică de către un ion a anumitor canale depinzînd atît de configuraţiile lor geometrice, cît şi de grupările chimice pe care le conţin.

II.1.4. Compoziţia membranelor axonale

Una dintre condiţiile preliminare pentru înţelegerea aspectelor moleculare ale conducerii excitaţiei în nerv este cunoaşterea cît mai detaliată a compoziţiei membranelor axonale pentru a avea o imagine adecvată a existenţei şi ponderii pe care o au diferitele sisteme moleculare implicate în funcţionarea membranei excitabile. Studii ample vizînd caracterizarea biochimică a membranelor axonului gigant de calmar (Camejo şi colab., 1969), axonilor mari nemielinizaţi de homar (Barnola şi colab., 1973) şi de crab (Balerna şi colab., 1975), precum şi a altor nervi nemielinizaţi au permis obţinerea în ultimii ani a unui tablou suficient de detaliat al compoziţiei acestor membrane, pentru ca să se poată avea în vedere în mod realist posibilitatea reconstituirii lor artificiale.

Principala caracteristică a membranei axonale este conţinutul ei foarte scăzut de proteine, masa de proteine fiind numai între 30 şi 40% din aceea de lipide. Din acest punct de vedere, membrana axonală se aseamănă cu mielina.

Membrana axonală conţine proteine de tip contractil care se comportă ca şi cum ar fi miozină, actină, tropomiozină şi tubulină. Ea conţine, de asemenea, ATP-ază de transport al sodiului şi potasiului (Na, K—ATP-ază) şi acetilcolinesterază (AChE). După solubilizare, aceste două enzime au masele moleculare de 280 000 şi respectiv 270 000 u şi apar ca fiind constituite din subunităţi cu masa de 96 000 şi respectiv 71 000 u (Balerna şi colab., 1975).

În membranele din axonii de crustacee, cantitatea de proteine care participă în mod specific la alcătuirea canalelor pentru sodiu este de 30 × mai mică decît Na, K—ATP-aza şi de 7 × mai mică decît AChE. În axolema de homar, este destul de răspîndită şi o proteină care se comportă ca receptor de acetilcolină (Denburg şi colab., 1972), dar ea lipseşte la crab (Balerna şi colab., 1975), astfel încît este greu de precizat dacă această proteină are o semnificaţie generală pentru funcţia membranelor excitabile, aşa cum presupun modelele biochimice ale excitabilităţii (Nachmansohn, 1974; Neumann şi colab., 1973).

Nici în ceea ce priveşte proteinele de tip contractil, menţionate mai sus, nu este pînă în prezent evident dacă şi în ce fel sînt asociate cu excitabilitatea, cu atît mai mult cu cît ele se găsesc şi în membrane neexcitabile, ca de exemplu în eritrocit (Guidotti, 1972).

II.1.5. Multitudinea membranelor artificiale excitabile

Straturile lipidice bimoleculare cu „materiale inductoare de excitabilitate" adiţionate pe ele s-au impus în mod firesc drept cel mai adecvat model artificial de membrane excitabile, datorită marilor asemănări structurale cu membranele celulare. Însă, în ceea ce priveşte fenomenologia manifestărilor electrice, mai sînt şi alte tipuri de membrane artificiale capabile ca, sub influenţa unui cîmp electric care depăşeşte o anumită valoare prag, să prezinte o scădere bruscă şi tranzitorie a rezistenţei lor electrice, fiind din acest punct de vedere membrane excitabile.

Monnier şi colab. (1965) au studiat pe larg membranele formate prin polimerizarea oxidativă a lipidelor nesaturate (uleiuri vegetale) pe suprafaţa unei soluţii oxidante de $KMnO_4$. Prin această polimerizare oxidativă se formează membrane cu grosime sub 1 μm constînd dintr-o reţea mole-

Scanned with OKEN Scanner

culară tridimensională în care sînt grupări peroxidice, aldehidice, alcoolice şi acide. Deşi nu au nici o asemănare structurală cu membranele celulare excitabile, aceste membrane artificiale prezintă următoarele proprietăţi, practic identice cu ale acestora : a) sînt selective pentru cationi ; b) permeabilitatea pentru K^+ este de circa 10 × mai mare decît pentru Na^+ ; c) sînt rectificante, adică dependenţa curentului de tensiunea aplicată este neliniară şi asimetrică (fig. II.5.) în cele două sensuri ; d) conductanţa lor creşte brusc şi tranzitoriu peste anumite valori ale tensiunii aplicate, apărînd chiar un astfel de răspuns oscilatoriu (Monnier, 1968 ; 1969) (fig. II.6).

Faptul că acest tip de membrane ca şi diferite alte sisteme artificiale (Monnier, 1973) prezintă proprietăţi pe baza cărora pot fi considerate excitabile derivă din structura lor moleculară atît hidrofobă cît şi, în mai mică măsură, hidrofilă avînd sarcini negative fixe. Asimetria structurală a membranelor face ca ionii care le traversează să întîlnească bariere de energie asimetrice, pe această bază putîndu-se explica fenomenul de rectificare. De asemenea, o creştere de 20 × a conductanţei ionice se poate explica printr-o scădere foarte mică (în jur de 1,8 kcal mol^{-1}) a barierei energetice

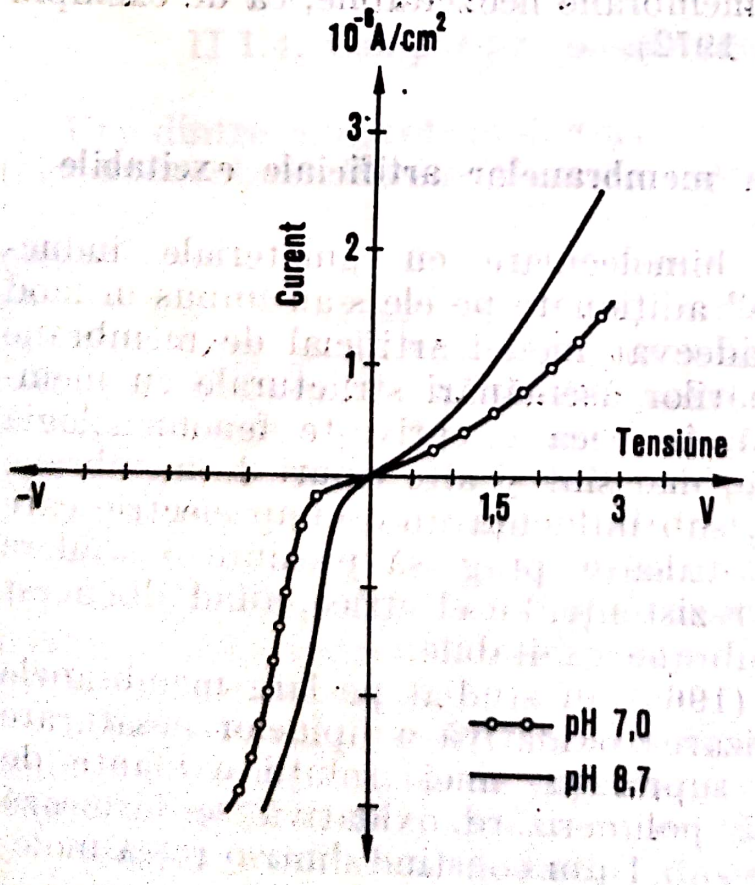


Fig. II.5. (după Monnier, 1968) : Caracteristica tensiune-curent a membranelor obţinute prin polimerizarea oxidativă a uleiurilor vegetale.

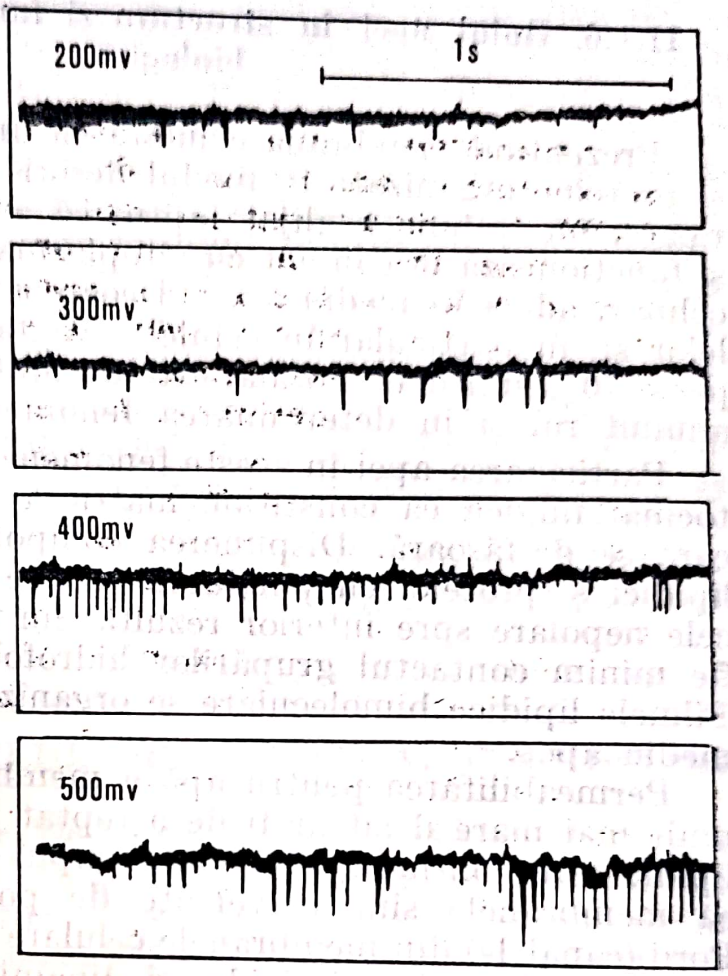


Fig. II. 6. (după Monnier, 1968): Răspunsul oscilatoriu al membranelor datorită variațiilor tranzitorii de conductanță, pentru diferențele de potențial indicate pe fiecare înregistrare.

care limitează difuzia cationilor, scădere ce s-ar putea datora modificărilor apărute sub influența cîmpului electric în bilanțul legăturilor de hidrogen dintre apa de hidratare a cationilor și grupările menționate anterior din rețeaua moleculară a membranei (Mărgineanu și Monnier, 1974).

În membranele artificiale preparate de Monnier, desigur că toți cationii și, în particular, sodiul și potasiul, trec prin aceiași pori (datorită omogenității de compoziție a acestor membrane), în timp ce în membranele naturale sînt în mod cert canale ionice separate. Faptul că și aceste membrane prezintă caracteristicile de excitabilitate menționate anterior este însă cu atît mai ușor de înțeles cu cît s-a demonstrat în mod general că toate caracteristicile de funcționare ale membranelor excitabile naturale pot fi explicate și prin modele teoretice în care Na^+ și K^+ sînt considerați că trec prin același canal (Offner, 1972).

II.1.6. Rolul apei în structura şi funcţia membranelor biologice

Prezentînd membrana celulară ca un ansamblu de lipide şi proteine organizate în modul descris în paragrafele anterioare, nu trebuie neglijat faptul că acest ansamblu există şi funcţionează în contact cu citoplasma şi cu fluidul extracelular, adică în mediu apos. Deoarece în majoritatea celulelor şi, în particular în celulele excitabile, apa reprezintă peste 70% din masa totală, este de presupus că ea joacă un anumit rol şi în determinarea fenomenelor de membrană.

Participarea apei în aceste fenomene este adesea ignorată tocmai fiindcă ea constituie matricea generală, mediul în care se desfăşoară. Dispunerea componenţilor membranari lipidici şi proteici cu porţiunile polare spre exterior şi cu cele nepolare spre interior rezultă din condiţia de a face să fie minim contactul grupărilor hidrofobe cu apa din jur. Filmele lipidice bimoleculare se organizează astfel numai în mediu apos.

Permeabilitatea pentru apă a membranelor celulare este mult mai mare decît ar fi de aşteptat în ipoteza că stratul lipidic este continuu, ceea ce a impus de mult timp ideea că membranele sînt traversate de pori umpluţi cu apă. Porii (canalele) din membranele celulare nu trebuie concepuţi ca structuri statice şi rigide, ci dinamice şi fluctuante atît în ceea ce priveşte forma, cît şi localizarea în cadrul membranei. Apa cu care sînt umpluţi aceşti pori nu pare a fi structurată în vreun fel deosebit faţă de apa plasmatică (Solomon, 1974), ceea ce permite trecerea unor fluxuri ample de apă şi eventual de solviţi prin ele. Fluxurile de apă prin membranele celulare se produc pentru a tampona modificările de compoziţie apărute fie în celulă, fie în mediul extern.

O ilustrare clară a importanţei pe care o au proprietăţile apei pentru desfăşurarea fenomenelor de membrană este oferită de modificările multiple care apar atunci cînd apa este înlocuită cu oxid de deuteriu (apa grea). Proprietăţile fizice ale apei grele sînt în general similare cu cele ale apei, cu excepţia acelor proprietăţi care depind direct de gradul de structurare internă prin punţi de hidrogen. Deoarece tăria punţii de deuteriu este cu $\approx 15\%$ mai mare decît a celei de hidrogen, viscozitatea apei grele este mai mare (cu $\approx 25\%$) decît a apei şi, implicit, coeficienţii de difuzie

în apă grea sînt mai mici. S-a constatat că apa grea reduce valoarea potențialului electric transmembranar și inhibă transportul activ (Vasilescu și Mărgineanu, 1970; 1971) afectînd în același timp și funcțiile fiziologice care depind de fenomene de membrană, așa cum sînt propagarea influxului nervos și contracția musculară. Explicația cea mai probabilă este că aceste efecte sînt datorate, în primă instanță, modificărilor de conformație ale proteinelor funcționale din membrane, care în prezența apei grele trec în configurații mai compacte și mai stabile, deci mai puțin dinamice. Ca urmare a acestora, se produc atît o scădere a permeabilității membranelor, cît și modificări ale activității enzimelor implicate în transport. Chiar dacă efectele substituirii apei cu apă grea asupra fenomenelor de membrană nu au încă decît explicații calitative, ele arată în mod evident importanța apei în determinarea structurii și funcției membranelor biologice.

II.2. POTENȚIALUL DE REPAUS AL CELULELOR

Printre caracteristicile definitorii de bază ale oricărei celule vii este și existența unei diferențe de potențial electric între fața externă și cea internă a membranei celulare. Deoarece atît citoplasma, cît și fluidele interstițiale sînt medii cu conductibilitate electrică ridicată, în interiorul lor potențialul electric este același în orice punct, astfel încît diferența de potențial dintre fețele membranei reprezintă variația de potențial între interiorul celulei și mediul extern. Acesta este *potențialul de repaus* celular, numit astfel prin opoziție cu variațiile de potențial din timpul activității celulelor excitabile.

Potențialul de repaus (PR) a fost inițial numit *potențial de demarcație* sau *de leziune*, datorită modalității în care era pus în evidență. Aceasta nu se putea face decît producîndu-se lezarea prin tăiere a unui pachet de fibre musculare sau nervoase, orientate aproximativ paralel între ele și aplicarea unuia din electrozi pe suprafața lezată și a altuia pe suprafața intactă. Este evident însă că potențialul de leziune măsurat astfel nu reprezintă decît o parte din adevăratul potențial de repaus, deoarece prin fluidul extracelular se produce o scurtcircuitare între porțiunea lezată și cea intactă (fig. II.7).

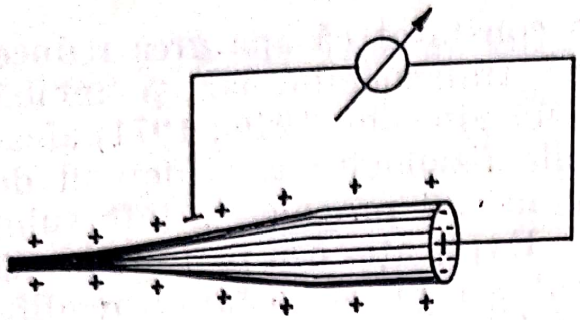


Fig. II.7. : Diferenţa de potenţial de demarcaţie între suprafaţa intactă şi cea lezată a unui muşchi.

A. L. Hodgkin şi A. F. Huxley au putut măsura chiar diferenţa reală de potenţial de membrană în axonul de cefalopode, căci datorită diametrului mare al acestor celule au putut introduce un electrod axial prin porţiunea tăiată pînă cînd se ajunge sub o porţiune de membrană suficient de îndepărtată ca să nu se manifeste efectul de scurtcircuitare menţionat anterior.

II.2.1. Microelectrozii intracelulari

Un moment ce poate fi considerat crucial pentru evoluţia fiziologiei celulare în general şi a biofizicii celulelor excitabile în particular l-a reprezentat dezvoltarea în 1949 de către G. Ling şi R. W. Gerard a tehnicii microelectrozilor de sticlă. Aceştia sînt micropipete din sticlă obţinute prin tragere la cald, astfel încît vîrful să nu fie mai gros de 0,5 μm. Străpungerea membranei celulare de către vîrful micropipetei nu produce vreo lezare considerabilă, iar contactul de scurtcircuitare între citoplasmă şi fluidul extracelular nu are loc, deoarece membrana se strînge în jurul vîrfului de sticlă (datorită tensiunii interfaciale).

Micropipeta este umplută (prin capilaritate, la cald şi sub presiune scăzută) cu o soluţie de concentraţie 3 M de KCl. Concentraţia trebuie să fie ridicată (3 M fiind aproape de saturaţie), pentru a reduce pe cît posibil rezistenţa internă a electrodului, aceasta fiind mare datorită secţiunii foarte mici. Chiar în condiţiile utilizării acestei soluţii cu conductanţă mare, rezistenţa microelectrozilor de sticlă este de ordinul a 10 MΩ, ceea ce impune ca amplificatorii utilizaţi pentru măsurarea biopotenţialelor culese prin intermediul lor să aibă şi ei o rezistenţă de intrare foarte mare. Umplerea se face cu soluţie KCl, deoarece ionii K^+ şi Cl^- sînt netoxici (ei găsindu-se şi în citoplasmă) şi ambii au aceeaşi mobilitate, astfel încît nu apar potenţiale de joncţiune

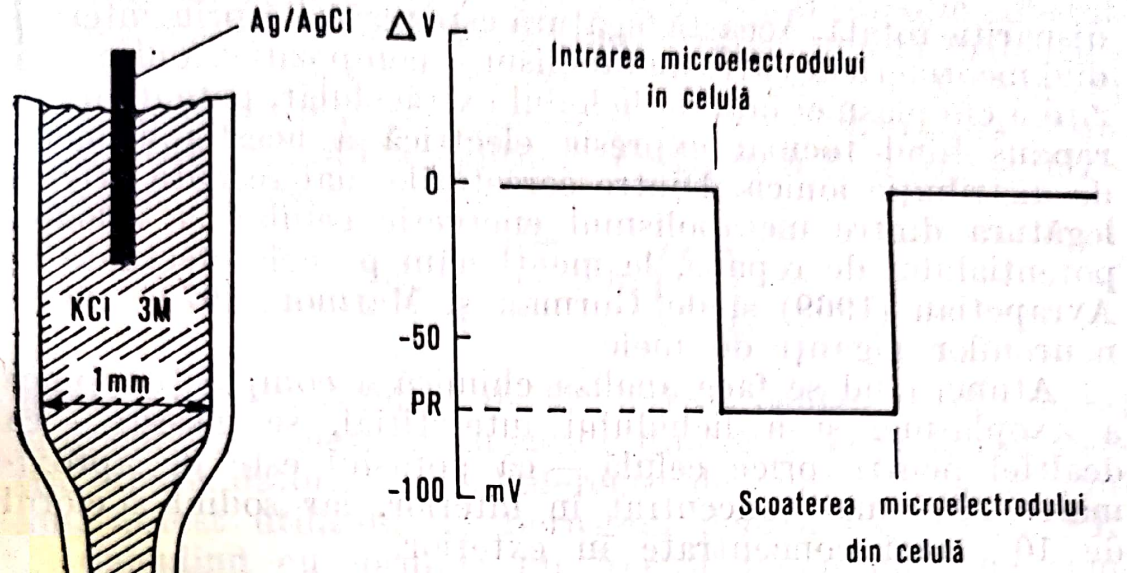


Fig. II.9. : Diferenţa de potenţial între un electrod de referinţă plasat în soluţia externă şi un microelectrod, la pătrunderea şi ieşirea dintr-o celulă. PR este potenţialul de repaus.

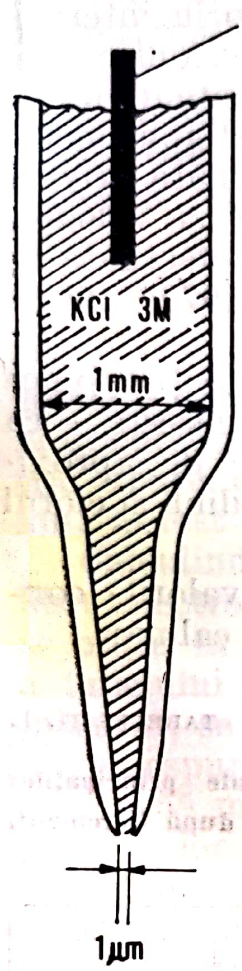


Fig. II.8. : Micropipetă de sticlă utilizabilă ca electrod intracelular. ←

la contactul lor cu citoplasma, deci valoarea reală a potenţialelor celulare nu este modificată.

Atunci cînd un microelectrod străpunge membrana celulară intrînd în citoplasmă, între el şi un electrod nepolarizabil (de exemplu, un electrod de calomel) plasat în soluţia externă apare o diferenţă de potenţial, interiorul celulei fiind totdeauna negativ faţă de exterior (fig. II.9.). Acesta este *potenţialul de repaus* (PR) care are valori bine determinate pentru fiecare celulă, variind între —50 şi —100 mV, pentru celulele nervoase fiind în mod obişnuit între —60 şi —80 mV.

II.2.2. PR şi distribuţia ionilor în celulă

Între PR şi metabolismul celular este o legătură evidentă, căci lipsa de oxigen, inhibitorii metabolici generali, ca şi scăderea temperaturii produc reducerea valorii PR pînă la

dispariţie totală. Această legătură este realizată prin intermediul menţinerii de către metabolism a compoziţiei ionice diferite a citoplasmei faţă de lichidul extracelular, potenţialul de repaus fiind tocmai expresia electrică a acestei asimetrii de distribuţie ionică. Dintre cercetările mai recente privind legătura dintre metabolismul energetic celular şi valoarea potenţialului de repaus, le menţionăm pe cele efectuate de Ayrapetian (1969) şi de Gorman şi Marmor (1970) asupra neuronilor giganţi de melc.

Atunci cînd se face analiza chimică a compoziţiei ionice a axoplasmei şi a lichidului interstiţial, se găseşte — ca dealtfel pentru orice celulă — că potasiul este de aproximativ 20 × mai concentrat în interior, iar sodiul şi clorul de 10 × mai concentrate în exterior.

Pentru ilustrare, în tabelul II.1. sînt date valorile concentraţiilor ionice în cazul axonului gigant de calmar.

TABELUL II. 1.

Concentraţiile şi potenţialele de echilibru electrochimic ale principalilor ioni în axonul gigant de *Loligo*. PR = — 61 mV (date citate după Gerebtzoff şi Schoffeniels, 1960)

	Na^+	K^+	Cl^-	
Interior	45	410	40	mM
Exterior	440	22	560	mM
Potenţiale de echilibru electrochimic	+55	−74	−66	mV

Încă de la începutul acestui secol, J. Bernstein, remarcînd diferenţele mari de concentraţii ionice dintre citoplasma celulelor vii şi exterior, a afirmat că PR reprezintă potenţialul de echilibru electrochimic între cele două compartimente ale potasiului, deoarece membrana celulară ar fi permeabilă selectiv numai pentru acest ion. Valoarea potenţialului de echilibru electrochimic al potasiului se deduce din condiţia ca diferenţa de potenţial electric E_k să anuleze efectul existenţei unor concentraţii diferite în exterior şi interior, C_k^e şi C_k^i, adică trebuie ca travaliul electric necesar pentru transportul unui mol de potasiu contra diferenţei de potenţial E_k : $F \cdot E_k$ (unde F = 96 500 C reprezintă sarcina electrică a unui mol

de ioni monovalenţi) să fie egal cu travaliul osmotic eliberat la trecerea acelui mol de la concentraţia internă mai mare la aceea mai mică din exterior: $RT \cdot \ln(C_k^e) - RT \cdot \ln(C_k^i)$ (unde R este constanta gazelor şi T este temperatura absolută). Din această condiţie: $F \cdot E_k = RT \cdot \ln(C_k^e) - RT \cdot \ln(C_k^i)$, rezultă:

$$E_k = \frac{RT}{F} \cdot \ln\left(\frac{C_k^e}{C_k^i}\right).$$

Această relaţie, stabilită de W. Nernst pentru cazul general al oricărei pile electrice în care o diferenţă de potenţial electric apare datorită unei diferenţe de concentraţie a unui ion, a fost utilizată de Bernstein pentru explicarea PR.

Calculînd cu formula lui Nernst potenţialele de echilibru electrochimic atît pentru K^+, cît şi pentru Na^+ şi Cl^- se obţin în cazul axonului gigant valorile din ultima linie a tabelului II.1. Comparînd aceste valori calculate cu PR măsurat, se deduce că în timp ce distribuţia ionică a sodiului corespunde unui potenţial de echilibru total diferit de PR (+55 mV faţă de −61 mV), atît pentru potasiu, cît şi pentru clor distribuţia corespunde aproximativ condiţiei de echilibru.

Pentru a putea distinge dacă PR provine din distribuţia ionică a potasiului sau a clorului, se poate urmări dependenţa valorii PR de concentraţia în exterior a fiecăruia din aceşti ioni. Acest gen de studii au arătat că variaţiile concentraţiei Cl^- în soluţia externă, la fel ca şi variaţiile concentraţiei Na^+, nu au decît o influenţă neglijabilă asupra potenţialului de repaus. Dacă însă se schimbă concentraţia K^+, se constată o variaţie logaritmică de tipul prezis de relaţia lui Nernst. Dintre numeroasele cercetări care confirmă acest fapt, în fig. II.10 sînt reproduse rezultatele lui Kuffler şi colab. (1966) privind variaţia potenţialului de membrană al nevrogliei de amfibian în funcţie de concentraţia K^+ în soluţia externă.

În mod riguros, în formula lui Nernst pentru potenţialul de echilibru electrochimic nu intervin concentraţiile care sînt măsurate prin dozări chimice sau spectroscopice, ci *activităţile ionice*. Activitatea unui ion în soluţie este produsul dintre concentraţia sa şi un coeficient de activitate care exprimă forţele de interacţie ale acelui ion în soluţie: $a_i = C_i \cdot f_i$. Un grad ridicat de legare a ionului respectiv

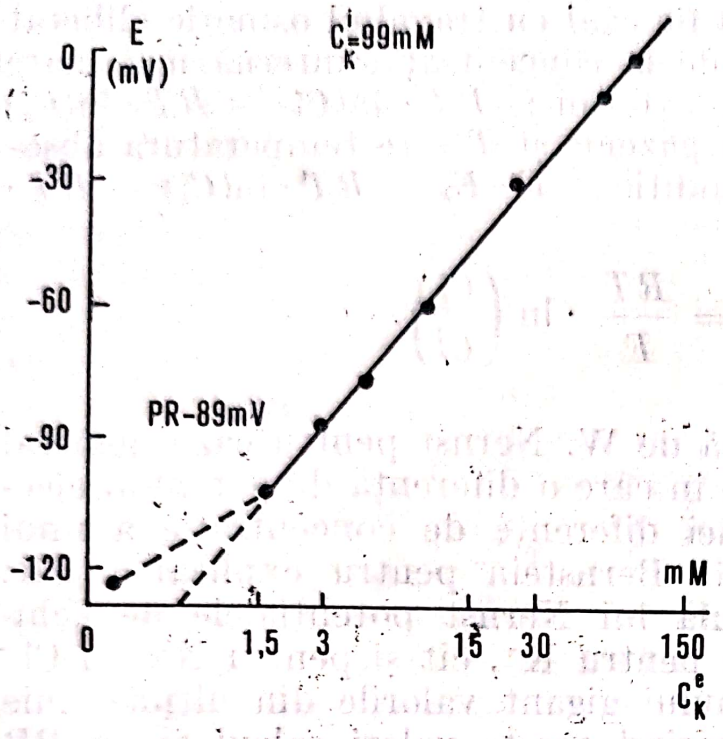


Fig. II.10. (după Kuffler şi colab., 1966): Variaţia potenţialului de membrană E al unei nevroglii de amfibian în funcţie de concentraţia externă a potasiului (C_k^e).

în cadrul unor structuri care îl împiedică să difuzeze liber se traduce printr-un coeficient scăzut de activitate.

În cadrul teoriei „asociaţiei şi a inducţiei", Ling (1962) presupune că potasiul este adsorbit în mod preferenţial faţă de sodiu în ochiurile unei reţele citoplasmatice de molecule proteice structurate tridimensional, reţea în care el poate intra datorită razei sale mai mici în stare hidratată. O astfel de legare preferenţială a potasiului ar determina o activitate a sa mult mai mică decît concentraţia aparentă stabilită prin dozare chimică şi implicit consideraţiile anterioare bazate pe aplicarea ca mai sus a formulei Nernst şi-ar pierde valabilitatea. Însă, încă din 1953, A. L. Hodgkin şi R. D. Keynes au determinat — pe baza migrării electroforetice (în cîmp electric) — mobilitatea şi coeficientul de difuzie a potasiului în axoplasma axonului gigant, găsindu-le apropiate de valorile din soluţii libere, ceea ce pledează contra unei legări semnificative a acestui ion în axoplasmă. Lucrînd cu microelectrozi din sticle selective pentru Na^+ şi K^+, Hinke (1961) a putut măsura direct activităţile ionice, deoarece un microelectrod selectiv indică un potenţial electric care depinde nu de concentraţie, ci chiar de activitatea ionului pentru care este permeabilă în mod selectiv sticla din care este făcut (Kleinzeller şi colab., 1969). El a confirmat faptul că pentru potasiu coeficientul de activitate în axoplasmă este acelaşi ca şi în soluţia Ringer şi a arătat

că tocmai ionul de sodiu este „legat" în axoplasmă în proporție de 25%, contrar presupunerilor din ipoteza lui Ling.

În concluzie, utilizarea formulei lui Nernst în care să apară concentrațiile ionice este justificată, cel puțin în ceea ce privește potasiul. Referitor însă la mărimea potențialului de repaus, atît datele din tabelul II.1, cît și cele din fig. II.10. arată că sînt abateri de la valoarea prezisă de formula lui Nernst aplicată pentru K^+. Asimilarea PR cu potențialul de echilibru al K^+ se bazează pe ipoteza că membrana celulară este impermeabilă pentru Na^+. Această ipoteză are la bază observația că sodiul rămîne mult mai abundent în spațiul extracelular față de citoplasmă, deși atît gradientul de concentrație, cît și cel de potențial electric tind să-l introducă în celule.

Cercetările lui R. D. Keynes și A. L. Hodgkin de la începutul anilor 1950, referitoare la fluxurile de ioni radioactivi prin membrana axonală, au arătat în mod cert că sodiul intră în mod pasiv din exterior în axoplasmă, dar concentrația sa rămîne constantă datorită unui mecanism de scoatere afară din celulă contra gradientului de potențial electric și de concentrație; pentru acest transport fiind necesară energie metabolică. De aici rezultă concluzia foarte importantă că membranele celulare în general și axolema în particular sînt permeabile și pentru sodiu, iar starea de repaus a celulelor nu corespunde unei anumite distribuții de echilibru a ionilor, ci este o *stare staționară*. Prin membrană au loc în permanență fluxuri ionice pasive în sensul gradienților de potențial electrochimic, dar care sînt compensate de fluxuri în sens contrar desfășurate cu consum de energie metabolică.

În aceste condiții potențialul de repaus celular nu mai poate fi atribuit echilibrului electrochimic al vreunui tip de ioni, ci el reprezintă acea diferență de potențial electric transmembranar pentru care curentul electric total prin membrană, datorat tuturor tipurilor de ioni, se anulează. Această condiție este foarte naturală, deoarece dacă ar exista un curent electric net diferit de zero, ar însemna să fie o permanentă acumulare de sarcini electrice în unul din compartimente (interior și exterior) în raport cu celălalt. Evident însă că această condiție nu exclude existența unor fluxuri nete ale fiecărui tip de ioni. Dacă în plus de condiția curentului total nul se face și ipoteza că diferența de potențial măsurată între interiorul și exteriorul celulei este distribuită uniform

pe grosimea membranei, adică în membrană este un cîmp electric constant, atunci se poate face o integrare a ecuaţiilor de difuzie a celor trei ioni permeanţi principali: K^+, Cl^- şi Na^+. Din această ecuaţie se poate explicita valoarea potenţialului de membrană în funcţie de concentraţiile ionice în interior şi exterior şi de permeabilitatea membranei pentru fiecare din aceşti ioni: P_K, P_{Cl} şi P_{Na}. Permeabilităţile reprezintă raportul dintre coeficientul de difuzie prin membrană a respectivului ion şi grosimea membranei, fiind proporţionale cu mobilităţile ionilor prin membrană.

Relaţia dedusă de D. E. Goldman în 1943, iar apoi de Hodgkin şi Katz (1949), pentru potenţialul de repaus prin integrarea ecuaţiilor de difuzie ale potasiului, sodiului şi clorului în condiţii de cîmp constant şi curent total nul, este:

$$PR = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K C_K^e + P_{Na} C_{Na}^e + P_{Cl} C_{Cl}^i}{P_K C_K^i + P_{Na} C_{Na}^i + P_{Cl} C_{Cl}^e}.$$

Concordanţa valorilor măsurate experimental ale potenţialului de repaus cu cele prezise de această relaţie, pentru diferite concentraţii în soluţia externă, este mult mai bună decît cea obţinută cu formula simplă a lui Nernst şi a fost verificată pentru diferite celule, printre care axonul gigant de calmar (Hodgkin şi Katz, 1949) şi neuronii de melc (Moreton, 1968). Sandblom şi Eisenman (1967) au dedus, pe baza termodinamicii proceselor ireversibile, o formă generală a ecuaţiei Goldman-Hodgkin-Katz (G—H—K) pentru cazul unei membrane permeabile faţă de un număr oarecare de anioni şi cationi monovalenţi, în condiţii de curent total nul, izotonicitate între interiorul şi exteriorul celulei şi cîmp constant în membrană.

Se poate observa imediat că formula G—H—K se reduce la formula simplă a lui Nernst dacă atît P_{Cl} cît şi P_{Na} sînt mult mai mici decît P_K, ceea ce explică faptul discutat anterior că PR depinde în mod evident logaritmic de concentraţia externă a potasiului şi este puţin influenţat de variaţiile concentraţiei sodiului.

Formula G—H—K este utilizată pentru determinarea raporturilor de permeabilităţi ionice atunci cînd se cunosc concentraţiile ionice în interiorul şi exteriorul celulei:

$$PR = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_K^e + (P_{Na}/P_K) C_{Na}^e + (P_{Cl}/P_K) C_{Cl}^i}{C_K^i + (P_{Na}/P_K) C_{Na}^i + (P_{Cl}/P_K) C_{Cl}^e}.$$

În multe cazuri, cum ar fi neuronii de moluşte sau muşchiul de broască, fie contribuţia clorului la PR este neglijabilă, fie se poate lucra în soluţii fără clor, aşa încît rămîn numai contribuţiile potasiului şi sodiului. De asemenea, deoarece $P_{Na} < P_K$ şi $C^i_{Na} \ll C^i_K$ şi termenul $(P_{Na}/P_K)C^i_{Na}$ poate fi neglijat, astfel încît rămîne:

$$\mathrm{PR} \approx \frac{RT}{F} \ln \frac{C^e_K + (P_{Na}/P_K)C^e_{Na}}{C^i_K},$$

formulă pe baza căreia poate fi dedus mult mai simplu raportul de permeabilitate P_{Na}/P_K, sau, dacă acesta este cunoscut din măsurători de fluxuri, se poate estima concentraţia internă a potasiului.

O expresie mai simplă a potenţialului de repaus poate fi scrisă în funcţie de potenţialele de echilibru electrochimic ale fiecărui ion şi de conductanţele membranei pentru aceştia (subcapitolul II.4), acea expresie fiind identică în fond cu formula G—H—K, dar conţinînd mărimi de tip electric: potenţiale de echilibru electrochimic în loc de concentraţii şi conductanţe în loc de permeabilităţi.

II.3. TRANSPORTUL ACTIV

Noţiunea de transport „activ" sau „fiziologic" a fost introdusă de E. Overton care a observat, în 1895, că celulele vii sînt capabile să menţină diferenţe fixe de concentraţie între citoplasmă şi mediu pentru substanţe care pot difuza prin membrana celulară, deci care ar tinde să-şi egalizeze concentraţiile de o parte şi de alta a membranei.

Transportul activ este întîlnit încă de la cele mai simple organisme vii, el părînd a fi una dintre caracteristicile definitorii ale materiei vii în ansamblu. Forme dintre cele mai evidente de transport activ se întîlnesc la animalele şi plantele care trăiesc în deşerturi sărate şi la păsările de mare care consumă apă sărată. La acestea, excesul de sare este secretat prin glande special adaptate în acest sens, aşa-numitele „glande nazale". În Marea Moartă, au fost găsite bacterii care reuşesc să trăiască şi să se înmulţească în soluţii saline cu concentraţii de pînă la 28%, deci care sînt nevoite să dezvolte un transport activ deosebit de intens.

II.3.1. Dependenţa transportului activ de metabolismul energetic celular

Studiile cu trasori radioactivi au evidenţiat în mod direct faptul că în celulele vii are loc transportul unor constituenţi în sens contrar gradienţilor electrochimici respectivi şi că acest transport încetează atunci cînd metabolismul respectivului sistem este inhibat.

Se cunoaşte de mult timp faptul că în celulele menţinute la temperatură scăzută se acumulează sodiu şi iese potasiu, căci scăderea temperaturii inhibă puternic reacţiile metabolice prin care se furnizează energie pentru transportul activ, în timp ce fluxurile pasive de difuzie sînt mult mai puţin afectate. Odată cu revenirea la temperatura obişnuită, excesul de sodiu este pompat în afară şi potasiul este reintrodus în celule (Steinbach, 1951). Hodgkin şi Keynes (1955) au constatat că fluxul de sodiu radioactiv din axonii giganţi de calmar este puternic redus de către inhibitorii metabolismului celular (cianuri, azide, dinitrofenol), adică de substanţele care blochează formarea de fosfaţi macroergici, întrerupînd cuplajul dintre metabolismul oxidativ şi fosforilarea ADP. Shanes şi Berman (1955) au arătat, de asemenea, că lipsa de oxigen inhibă efluxul de sodiu radioactiv din axonii giganţi. Toate acestea sînt dovezi clare ale faptului că în celule funcţionează un mecanism de pompare activă în exterior a sodiului, care intră în celulă împins de gradienţii de concentraţie şi de potenţial electric, mecanism care consumă energie metabolică.

Caldwell şi colab. (1960) au dovedit în mod direct faptul că pentru transportul activ al sodiului sînt utilizaţi fosfaţi macroergici, arătînd că injectarea de ATP sau argininfosfat în axoni giganţi, în care efluxul de sodiu a fost inhibat cu cianură, produce o reluare a efluxului pînă la consumarea cantităţii de fosfaţi injectată. Introducerea în axon a fosfaţilor respectivi descompuşi prin încălzire nu determină reluarea transportului activ, căci legăturile macroergice, din a căror hidroliză se furnizează energia necesară pentru transport, sînt deja rupte.

Termenul „pompă de sodiu şi potasiu" sau pe scurt „pompa de sodiu" desemnează în mod sugestiv utilizarea energiei rezultate din hidroliza ATP pentru efectuarea transportului activ al acestor ioni în sens contrar tendinţei lor

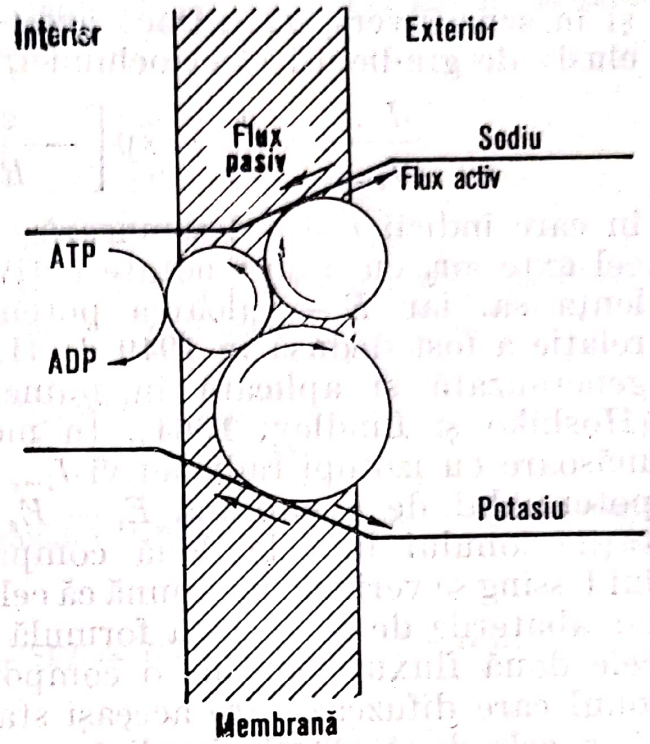


Fig. II.11. : Ilustrare a conceptului de „pompă ionică", la care hidroliza ATP antrenează fluxuri de Na^+ şi de K^+ de la valori mai mici ale potenţialelor electrochimice către valori mai mari.

de difuzie dinspre potenţialul electrochimic mai mare spre valori mai mici ale acestuia. Corespunzător acestui concept se fac reprezentări intuitive de tipul celei din fig. II.11. Subliniem faptul evident că acest gen de reprezentări nu au decît rol ilustrativ, conceptului macroscopic de esenţă tehnică al „pompei" corespunzîndu-i la nivelul membranelor celulare agregate moleculare capabile să realizeze funcţia de transport.

II.3.2. Distincţia dintre fluxurile ionice pasive şi active

Transportul activ este definit ca acea parte din fluxul unei substanţe printr-o membrană biologică ce nu poate fi atribuită forţelor pasive, adică gradienţilor electrochimici, şi care se realizează prin intermediul cuplajului cu reacţii chimice care furnizează energia necesară desfăşurării procesului de transport (Kedem, 1961).

Există mai multe posibilităţi de a pune în evidenţă existenţa unor fluxuri ionice active. O distincţie clară poate fi făcută măsurînd cu izotopi radioactivi fluxurile unidirecţionale dinspre interiorul către exteriorul membranei, $J_{i\to e}$

şi în sens invers, $J_{e\to i}$. Dacă aceste fluxuri sînt produse exclusiv de gradienţii electrochimici, atunci raportul lor este:

$$\frac{J_{i\to e}}{J_{e\to i}} = \frac{a_i}{a_e} \cdot \exp\left[-\frac{zF}{RT}(E_e - E_i)\right],$$

în care indicii i şi e desemnează compartimentul interior şi cel exterior, cu a sînt notate activităţile ionului, z este valenţa sa, iar E — valoarea potenţialului electric. Această relaţie a fost dedusă în 1949 de H. H. Ussing, fiind ulterior generalizată şi aplicată în numeroase probleme concrete (Hoshiko şi Lindley, 1964). În mod practic, trebuie să se măsoare cu izotopi radioactivi $J_{i\to e}$ şi $J_{e\to i}$, cu microelectrozi potenţialul de membrană $E_i - E_e$ şi să se cunoască activităţile ionului în cele două compartimente. Dacă formula lui Ussing se verifică, înseamnă că cele două fluxuri sînt pasive, iar abaterile de la această formulă indică faptul că unul din cele două fluxuri conţine o componentă activă. Ipoteza că ionul care difuzează are aceeaşi stare chimică în membrană şi în cele două soluţii implică egalitatea factorilor de activitate în cele două compartimente, astfel că în loc de raportul activităţilor se poate utiliza raportul concentraţiilor C_i şi C_e măsurabile prin analize chimice.

Forţa totală care acţionează asupra unui ion este gradientul potenţialului său electrochimic $\bar{\mu}$, în sensul scăderii sale: $-\frac{d\bar{\mu}}{dx}$ (fig. II.12.), iar fluxul

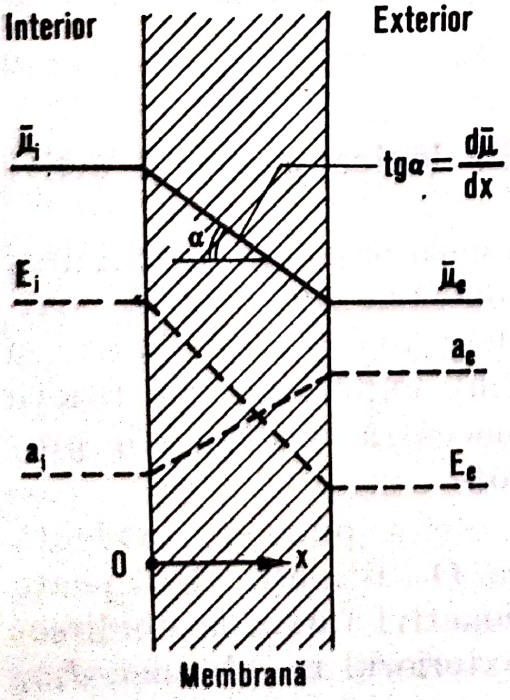


Fig. II.12.: Variaţia între două compartimente ale potenţialului electrochimic μ_i al unui ion avînd diferite activităţi a_i şi a_e şi atunci cînd potenţialul electric are valori diferite (E_i şi E_e).

este evident proporţional atît cu forţa, cît şi cu numărul de ioni din unitatea de volum, deci cu concentraţia:

$$J = -kC\frac{d\bar{\mu}}{dx},$$

k fiind o constantă de permeabilitate.

Potenţialul electrochimic este: $\bar{\mu} = \mu_0 + RT\ln a + zFE$, μ_0 fiind o valoare constantă de referinţă, iar $a = C.f$, deci:

$$\frac{d\bar{\mu}}{dx} = RT\frac{d\ln a}{dx} + zF\frac{dE}{dx}.$$

Se poate înlocui activitatea chimică a printr-o *activitate electrochimică* $\bar{a}$, definită prin relaţia:

$$RT\ln\bar{a} = RT\ln a + zFE = RT\ln C + RT\ln f + zFE,$$

astfel încît: $C = \frac{\bar{a}}{f}\exp(-zFE/RT)$

şi:

$$\frac{d\bar{\mu}}{dx} = RT\frac{d\ln\bar{a}}{dx}.$$

Cu acestea, expresia fluxului este:

$$J = -kRT\frac{\bar{a}}{f}\frac{d\ln\bar{a}}{dx}\exp(-zFE/RT) = -\frac{1}{f}kRT\frac{d\bar{a}}{dx}\exp(-zFE/RT),$$

iar raportul fluxurilor în sensuri contrare este:

$$\frac{J_{i\to e}}{J_{e\to i}} = \frac{d\bar{a}_i(x)/dx}{d\bar{a}_e(x)/dx},$$

deoarece pentru aceeaşi specie de ioni k, f şi E sînt identice într-un acelaşi punct x din membrană. Cu $\bar{a}_i(x)$ şi $\bar{a}_e(x)$ notăm activităţile electrochimice în fiecare punct x din membrană ale ionilor care provin respectiv din interior şi exterior. Această definiţie sugerează că este mai bine ca cele două fluxuri unidirecţionale să fie măsurate cu izotopi radioactivi diferiţi ai aceluiaşi ion, de exemplu cu ^{22}Na şi ^{24}Na, pentru a se evita mascarea lor reciprocă.

Ultima relaţie poate fi integrată pe grosimea membranei, astfel încît fiecare dintre cele două activităţi electrochimice să treacă de la valoarea zero la valorile constante $\bar{a}_i$ şi $\bar{a}_e$ din cele două compartimente:

$$\frac{J_{i\to e}}{J_{e\to i}} = \frac{\bar{a}_i}{\bar{a}_e} = \frac{a_i}{a_e} \exp\left[-\frac{zF}{RT}(E_e - E_i)\right].$$

O altă metodă de a pune în evidenţă fluxurile ionice active constă din anularea gradienţilor de concentraţie şi de potenţial electric care determină fluxurile pasive şi măsurarea în aceste condiţii a curentului electric între cele două compartimente, curent datorat numai fluxului activ de ioni. Aceasta este *metoda curentului de scurtcircuit*, elaborată în 1949 de H. H. Ussing. Această metodă permite studierea cantitativă detaliată a transportului activ şi a fost diversificată pentru multe preparate biologice (Kidder III, 1973), toate fiind însă numai epitelii. Numai în cazul epiteliilor, ale căror celule fac un transport activ „transmural" dintr-o parte în alta a ţesutului, este posibil să existe două compartimente suficient de mari şi accesibile, încît compoziţia ionică şi potenţialul electric să poată fi modificate aşa ca să nu existe gradienţi între cele două compartimente.

Modalitatea cea mai simplă şi aplicabilă în mod general de a separa componenta activă de cea pasivă a unui flux ionic constă din utilizarea de blocanţi specifici ai transportului activ. Astfel, substanţele numite glicozizi cardiaci (datorită utilizării lor medicale drept tonice cardiace), ca de exemplu ouabaina, blochează pompa de sodiu şi potasiu din membrana celulară, fără să afecteze metabolismul oxidativ al celulei, ci numai împiedicînd ca ATP-ul sintetizat să fie utilizat pentru transportul activ.

Caldwell (1968), analizînd o lungă serie de cercetări anterioare, arată că aplicarea de ouabaină în soluţia externă în care este plasat un axon gigant produce o blocare rapidă a efluxului de sodiu fără să altereze conţinutul în fosfaţi macroergici (ATP şi argininfosfat) al axonului. Această blocare nu este înlăturată de injectarea în axon de ATP, ceea ce confirmă faptul că ouabaina inhibă direct mecanismul pompei, spre deosebire de otrăvurile metabolice care blochează formarea de ATP. Atunci cînd ouabaina a fost injectată în interiorul axonului, nu se obţine blocare chiar

pentru concentraţii de 100 × mai mari decît cele care blochează din exterior, deci ouabaina inhibă o etapă a mecanismului pompei localizată la exteriorul membranei axonale.

II.3.3. ATP-aza de transport a sodiului şi potasiului

Sistemul care, în mod figurativ, este denumit „pompă de sodiu şi potasiu" reprezintă la nivelul membranei un agregat molecular capabil să hidrolizeze ATP şi să utilizeze energia eliberată pentru transferarea sodiului şi a potasiului în sens contrar gradienţilor electrochimici ai acestor ioni între citoplasmă şi exterior. Acest sistem este deci o ATP-ază de transport a sodiului şi potasiului (Na—K ATP-ază) a cărei activitate enzimatică este blocată de ouabaină şi este activată chiar de ionii de sodiu şi de potasiu.

Skou (1965; 1972) a analizat în detaliu proprietăţile ATP-azelor activate de sodiu şi de potasiu, care au fost izolate din diferite ţesuturi, evidenţiind dovezile care confirmă că acestea constituie sisteme de transport al acestor ioni. Astfel, aceste ATP-aze sînt localizate în membranele celulare şi intensitatea cu care ele hidrolizează ATP este proporţională cu concentraţia sodiului în interiorul celulei şi a potasiului în exterior. Tot la fel, în axonul gigant, intensitatea influxului activ de potasiu şi a efluxului activ de sodiu sînt proporţionale cu concentraţia sodiului în axoplasmă (Mullins şi Brinley, 1969).

Na—K ATP-aze există în toate celulele în care are loc transport activ al sodiului şi potasiului şi ele au locuri active cu afinitate mai mare pentru Na decît pentru K situate pe faţa internă a membranelor şi locuri active cu afinitate mai mare pentru potasiu situate pe faţa externă a membranelor. Această separare spaţială a locurilor active coincide cu cerinţa preluării fiecăruia dintre cei doi ioni din compartimentul în care se găsesc la concentraţie scăzută pentru a fi transferaţi şi „lăsaţi" în compartimentul în care sînt mai concentraţi. Glicozizii cardiaci inhibă similar şi Na—K ATP-azele extrase din celule şi transportul activ al sodiului şi potasiului în celulele intacte.

Garrahan şi Glynn (1967) au făcut ca „pompa de sodiu" să funcţioneze în sens invers, expunînd membrane eritrocitare la concentraţii externe de sodiu atît de mari, încît acest ion nu mai poate fi pompat spre exterior, ci el intră spre interior, antrenînd pompa în sens invers. Complexul

molecular care în mod normal hidrolizează ATP, comportîndu-se ca ATP-ază de transport, realizează şi el în aceste condiţii funcţia inversă, de sinteză a ATP din ADP şi fosfat anorganic. Ouabaina blochează şi această funcţionare în sens invers a pompei, ca şi funcţia directă de transport activ.

În ceea ce priveşte stoichiometria reacţiilor de transfer activ al sodiului şi potasiului, s-a dovedit că în celule de diferite tipuri energia rezultată din hidroliza unei molecule de ATP serveşte la pomparea activă în exterior a 3 ioni Na^+.

În cazul axonului gigant, în care sinteza metabolică de ATP a fost blocată cu cianură, formarea de fosfat anorganic din hidroliza acestuia de către ATP-ază este cu aproximativ 30% mai mică atunci cînd pompa de sodiu este inhibată de ouabaină. O reducere similară a activităţii ATP-azice o prezintă şi axoplasma izolată (fără membrană) în raport cu axonul în ansamblu (Baker şi Shaw, 1965).

În cazul eritrocitului, pomparea în exterior a celor trei ioni Na^+ corespunde cu reintroducerea în celulă a 2 ioni K^+ (Garrahan şi Glynn, 1967), însă în alte cazuri acest raport este variabil. Mullins şi Brinley (1969) au arătat că raportul dintre numărul de ioni Na^+ scoşi şi de K^+ introduşi în axonul gigant este variabil, crescînd cu cît concentraţia sodiului în interior este mai mare. Această posibilitate de a nu fi un cuplaj rigid între sodiu şi potasiu, chiar dacă ambii ioni sînt vehiculaţi de un acelaşi ionofor, permite ca pompajul ionic să se adapteze variaţiilor de condiţii care pot surveni, de exemplu, în urma conducerii impulsurilor.

O concluzie generală rezultată din studiile pe diferite tipuri de celule, atît nervoase cît şi de alte naturi, este că pompajul Na—K nu se face în raport de 1 : 1 astfel încît transportul activ al acestor ioni are un caracter direct *electrogen*, creînd un curent electric prin membrană care contribuie la stabilirea valorii potenţialului de repaus (Ritchie, 1971). Dată fiind însă conductanţa electrică mare a membranelor, această contribuţie este mică, de ordinul a cîţiva milivolţi, cea mai mare parte a PR datorîndu-se, aşa cum am văzut, distribuţiei asimetrice de ioni, menţinută tot de transportul activ. Caracterul electrogen al pompei de sodiu explică *hiperpolarizarea posttetanică*, constînd din creşterea valorii PR după o stimulare prelungită, atunci cînd transportul activ este intensificat pentru a restabili compoziţia ionică normală a axoplasmei.

II.3.4. Transportorii membranari de ioni

Deşi asupra transportului activ există o imagine clară atît în ceea ce priveşte modalităţile generale în care se desfăşoară, cît şi legătura sa cu metabolismul celular, referitor la succesiunea de transformări moleculare prin care se cuplează hidroliza ATP cu transferul de ioni prin membrana celulară, pînă în prezent sînt numai modele teoretice care îşi propun să redea caracteristicile cinetice şi energetice ale procesului.

Există diferite variante de modele în care, drept mediator al transportului activ este considerată o proteină membranară, capabilă să se întindă şi să se contracte în interiorul membranei. Astfel de proteine sînt presupuse a avea un loc specific de legare a moleculelor pe care le transportă, loc ce „face naveta" înainte şi înapoi prin membrană şi un al doilea loc specific de legare a unui substrat, de exemplu ATP, substrat care printr-o reacţie enzimatică să fie transformat într-un produs de reacţie: S → P (Blumenthal şi Kedem, 1969). Această proteină are deci un rol enzimatic cît şi unul de transport. În realitate, funcţiile ar putea fi distribuite pe mai mulţi componenţi membranari, iar reacţia chimică de transformare a substratului S în produsul P poate consta dintr-un şir întreg de reacţii. Corespunzător concepţiei după care celulele reglează din interior atît intensitatea transportului, cît şi concentraţiile speciilor transportate, se consideră că reacţia S → P are loc pe faţa internă a membranei şi că nici *S* nici *P* nu trec prin membrană.

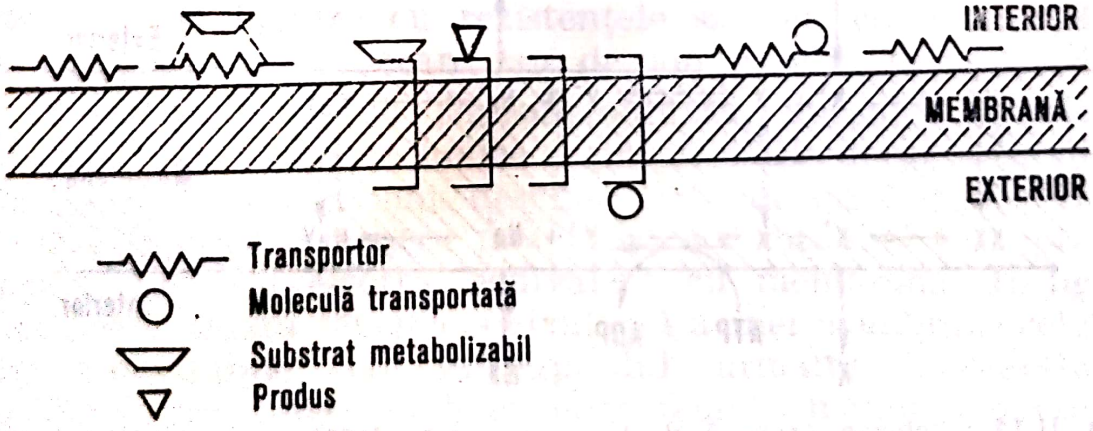


Fig. II.13. : Exemplu de transformări prin care un transportor poate să transfere prin membrană o anumită moleculă, catalizînd şi transformarea chimică a altei molecule.

În cadrul acestui model, transportul numai din exterior spre interior al substanţei transportate, reprezentată cu ○, poate fi efectuat prin secvenţa de stări redată în fig. II.13. Substratul, reprezentat prin ▽, se leagă de proteina contractată şi împiedică legarea pe locul de transport a unor molecule ○ de pe faţa internă a membranei. Complexul substrat-proteină se întinde, trăgînd substratul pe locul catalitic al reacţiei de transformare a sa în produs (reprezentat prin ▽). Produsul ▽ se disociază instantaneu de proteină. Aceasta leagă de pe faţa externă a membranei o moleculă ○, pe care, contractîndu-se, o aduce pe faţa internă a membranei. Se vede că, trecînd prin această secvenţă ciclică de stări, proteina enzimatică contractilă realizează cuplajul între transport şi reacţia chimică, cuplaj care constituie însăşi esenţa transportului activ.

Acest tip de model de transportor care vehiculează o singură substanţă poate fi considerat ca un caz particular al schemei generale de transport activ cuplat a două substanţe, de exemplu sodiu şi potasiu. Cross şi colab. (1965) au propus o schemă (fig. II.14) în care un transportor membranar Y leagă cu mare afinitate sodiu de pe faţa internă, trece prin membrană şi îl lasă în exterior. După eliberarea sodiului trece într-o altă conformaţie, X, în care, fie leagă cu mare afinitate potasiu, pe care îl va transfera pe faţa internă, fie trece neîncărcat cu nici un ion pe faţa internă. Dacă tranziţia Y → X poate fi spontană, atunci pentru

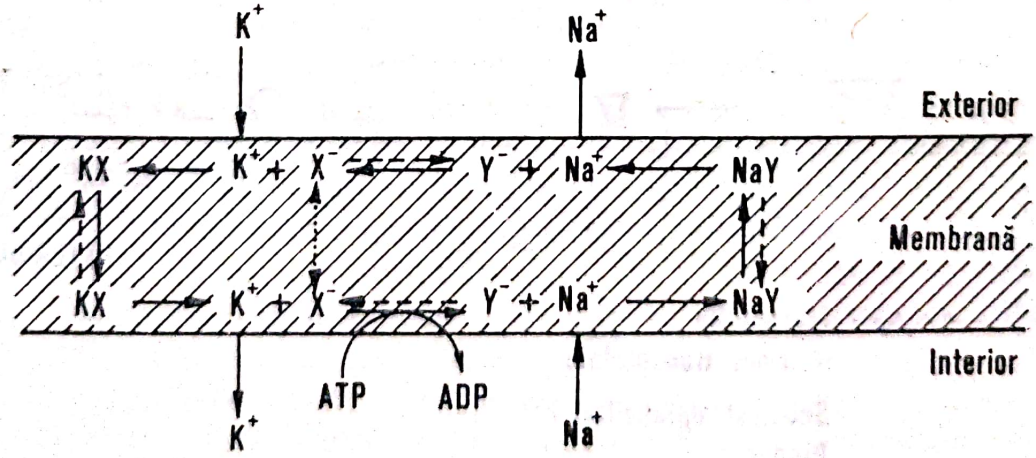


Fig. II.14. : Schema propusă de Cross şi colab. (1965) pentru transportul activ al sodiului şi potasiului, mediat de un transportor membranar care se poate găsi în două conformaţii, X şi Y. Dacă au loc şi tranziţiile figurate prin săgeata punctată, transportul activ este electrogenic.

producerea tranziției inverse care să permită reluarea ciclului este necesară utilizarea energiei rezultate din hidrolizai ATP.

Faptul că transportorii membranari de ioni, adică ionoforii, nu sînt încă precizați nici chimic și cu atît mai mult structural în membranele naturale, face ca descrierile de tipul acestei scheme să fie considerate doar modele cu caracter general și ipotetic. Pînă în prezent se poate spune numa că ansamblul celor doi ionofori pentru sodiu și potasiu, cuplați cu molecula capabilă să hidrolizeze ATP și să transfere energia rezultată la acești ionofori, constituie agregatul molecular localizat în membrană pe care îl denumim „ATP-aza de transport a sodiului și potasiului". În cadrul imaginii membranei celulare ca un mozaic fluid de lipide și proteine globulare, aceste agregate moleculare fac parte din proteinele intrinseci incluse în matricea lipidică a membranei.

II.4. DESCRIEREA MEMBRANELOR PRIN CIRCUITE ECHIVALENTE

Mărimile electrice pot fi măsurate cu mai mare precizie și rapiditate decît alte tipuri de parametri caracteristici sistemelor biologice în general și membranelor în particular, datorită în special sensibilității și posibilităților complexe de a prelucra semnalele de tip electric în aparatura electronică de măsură. Datorită acestui fapt, este foarte uzual ca în loc de concentrații ionice să se utilizeze potențialele de echilibru electrochimic, iar în loc de permeabilitățile membranei să se lucreze cu rezistențele sau cu conductanțele membranei pentru fiecare tip de ion care o traversează.

Potențialul electric transmembranar, curenții electrici vehiculați de fluxurile ionice și proprietățile de permeabilitate ale membranei sînt descrise (într-un mod eficient și adecvat în special pentru membranele excitabile) ca reprezentînd circuitul electric echivalent cu membrana. În fig. II.15., este redată schema echivalentă a unei membrane celulare neexcitabile, iar în capitolul următor (paragraful III. 3.2.), vom vedea și schema echivalentă a membranei axonale. Capacitatea electrică, C_M, a membranei exprimă proprietățile dielectrice ale acesteia, deci calitatea ei de a menține o încărcare electrică de semne contrare pe cele două fețe.

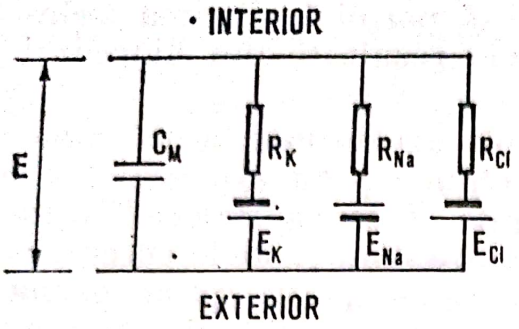


Fig. II.15. : Circuitul electric pe baza căruia pot fi descrise potențialul de repaus și fluxurile ionice prin membrana celulară.

Pentru toate membranele celulare, capacitatea este în jur de 1 $\mu F/cm^2$.

Bateriile de tensiuni E_K, E_{Na} și E_{Cl} reprezintă potențialele de echilibru electrochimic ale fiecăruia din acești ioni, în serie cu rezistențele R_K, R_{Na} și R_{Cl}, proprii canalelor specifice pentru fiecare ion.

Aplicînd legile lui Ohm circuitului din fig. II.15., se găsește în mod simplu valoarea diferenței de potențial E suportată de capacitatea C_M între cele două fețe ale membranei : $E = R_t \cdot I_t$, în care rezistența totală R_t echivalentă cu cele trei rezistențe în paralel este dată de : $\frac{1}{R_t} = \frac{1}{R_K} + \frac{1}{R_{Na}} + \frac{1}{R_{Cl}}$; iar curentul total este :

$$I_t = \frac{E_K}{R_K} + \frac{E_{Na}}{R_{Na}} + \frac{E_{Cl}}{R_{Cl}}.$$

Deci :

$$E = (E_K/R_K + E_{Na}/R_{Na} + E_{Cl}/R_{Cl})/(1/R_K + 1/R_{Na} + 1/R_{Cl}).$$

Dacă în loc de rezistențele R_i se lucrează cu conductanțele G_i ale membranei pentru fiecare tip de ion, ținînd seama că $G_i = \frac{1}{R_i}$, relația de mai sus devine :

$$E = (G_K E_K + G_{Na} E_{Na} + G_{Cl} E_{Cl})/(G_K + G_{Na} + G_{Cl}).$$

Această formulă este echivalentă cu ecuația $G-H-K$ (§ II.2.8.) și ea arată că potențialul de membrană E tinde să devină egal cu potențialul de echilibru electrochimic E_i

al acelui ion pentru care conductanţa membranei este mult mai mare decît faţă de ceilalţi.

Reprezentarea caracteristicilor electrice ale membranelor celulare, sub formă de baterii şi rezistenţe separate pentru fiecare ion, porneşte de la ideea existenţei în membrană a unor canale ionice separate, fapt confirmat de posibilitatea blocării selective a curenţilor electrici vehiculaţi de sodiu şi de potasiu prin membrana axonală şi de la principiul independenţei fluxurilor ionice (Hodgkin şi Huxley, 1952) care afirmă că fiecare flux ionic nu este influenţat decît de gradientul electrochimic al ionului respectiv. Acest gen de reprezentări stau la baza descrierii procesului de apariţie şi propagare a excitaţiei în membranele axonale şi în toate tipurile de membrane excitabile (Grundfest, 1966), inclusiv în cele sinaptice şi în membranele celulelor receptoare.

* * *

În acest capitol, consacrat membranelor celulare, au fost prezentate următoarele idei de bază:

Toate celulele sînt înconjurate la exterior de o membrană cu grosimea pînă la 100 Å formată din două straturi lipidice cu grupările hidrofobe aflate în contact; pe lipide sînt adsorbite şi pătrund chiar dintr-o parte în alta molecule proteice de conformaţie globulară. Acestea se pot deplasa în cadrul stratului lipidic, astfel că membrana se prezintă ca un mozaic fluid de lipide şi proteine globulare. Proprietăţile membranelor celulare sînt reproduse şi de filmele lipidice (formate între două soluţii apoase) care se structurează spontan ca straturi bimoleculare şi care adsorb proteine. Unele proteine pot induce astfel excitabilitatea acestor membrane, adică posibilitatea unei scăderi bruşte şi tranzitorii a rezistenţei lor electrice, constituind în membrane canale ionice.

Prin membranele celulare au loc fluxuri ionice determinate de gradienţii electrochimici respectivi, fluxuri care se produc prin canale ionice specializate, dar celula poate menţine diferenţe fixe de concentraţii ionice între citoplasmă şi exterior, efectuînd transport activ al ionilor contra gradienţilor electrochimici. Transportul activ se face cu consum de energie metabolică, transferul de ioni fiind cuplat cu hidroliza de ATP. Ansamblul molecular constînd din moleculele transportoare (ionoforii) de sodiu şi potasiu şi din cele care hidrolizează ATP şi transferă energia rezultată către

ionofori, este denumit în mod figurativ „pompa de sodiu şi potasiu". Ca rezultat al funcţionării pompelor ionice, celulele nu se află în echilibru, ci într-o stare staţionară în care fiecare flux ionic pasiv este compensat de un flux activ în sens invers. Distribuţia ionică asimetrică în citoplasmă şi exterior şi faptul că membrana are permeabilităţi diferite pentru fiecare ion fac ca între cele două feţe ale membranelor celulare să existe o diferenţă de potenţial electric — — potenţial de repaus — care în celulele neexcitabile se menţine constant, dar care dispare atunci cînd metabolismul celular este afectat. Potenţialul de repaus este expresia electrică a nivelului energetic ridicat în care se găsesc toate celulele vii, datorită existenţei gradienţilor electrochimici între interior şi exterior. Celulele excitabile au capacitatea să răspundă la stimuli externi degajînd în mod brusc o parte din energia stocată în aceşti gradienţi electrochimici, prin variaţia tranzitorie a potenţialului electric transmembranar.

BIBLIOGRAFIE

A. Referinţe generale

Cole, K. S. (1968), *Membranes, Ions and Impulses*, Univ. of California Press, Berkeley.

Guidotti, G. (1972), „Annu. Rev. Biochem.", *41*, 731.

Mărgineanu, D., Vasilescu, V. (1970), „Şt. Cerc. Fiziol.", *15*, 357.

Passow, H., Stämpfli, R. (ed.) (1969), *Laboratory Techniques in Membrane Biophysics*, Springer Verlag, Berlin.

Rothfield, L. I. (ed.) (1971), *Structure and Function of Biological Membranes*, Academic Press, New York.

Singer, S. J. (1974), „Annu. Rev. Biochem.", *43*, 805.

Skou, J. C. (1965), „Physiol. Rev.", *45*, 596.

Stoeckenius, W., Engelman, D. M. (1969), „J. Cell. Biol.", *42*, 613.

B. Referinţe speciale

Alexandrov, A. A., Berestovsky, G. N., Volkova, S. P., Vostrikov, Y. A., Kerelova, O. M. (1976), „Dokladi Akad. Nauk SSSR", *227*, 723.

Ayrapetian, S. N. (1969), „Biofizika", *14*, 663 şi 1027.

Armstrong, C. M. (1975), „Biophys. J.", *15*, 932.

Baker, P. F., Shaw, T. I. (1965), „J. Physiol.", *180*, 424.

BALERNA, M., FOSSET, M., CHICHEPORTICHE, R., ROMEY, G., LAZDUNSKI, M. (1975), „Biochemistry", *14*, 5500.

BARNOLA, F. V., VILLEGAS, R., CAMEJO, G. (1973), „Biochim. Biophys. Acta", *298*, 84.

BENZ, R., STARK, G., JANKO, K., KAÜGER, P. (1973), „J. Membrane Biol.", *14*, 339.

BLUMENTHAL, R., KEDEM, O. (1969), „Biophys. J.", *9*, 432.

CALDWELL, P. C. (1968), „Physiol. Rev.", *48*, 1.

CALDWELL, P. C., HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D., SHAW, T. I. (1960), „J. Physiol.", *152*, 561.

CAMEJO, G., VILLEGAS, G. M., BARNOLA, F. V., VILLEGAS, R. (1969), „Biochim. Biophys. Acta", *193*, 247.

CROSS, S. B., KEYNES, R. D., RYBOVA, R. (1965), „J. Physiol.", *181*, 865.

DENBURG, J. L., ELDEFRAWI, M. E., O'BRIEN, R. D., (1972), „Proc. Natl. Acad. Sci. USA", *69*, 177.

EHRENSTEIN, G., LECAR, H. (1977), „Quart. Rev. Biophys.", *10*, 1.

EIGEN, M., WINKLER, R. (1970), În *The Neurosciences : Second Study Program*, F. O. SCHMITT (ed.), Rockefeller Univ. Press, New York.

EISENBERG, M., HALL, J. E., MEAD, C. A. (1974), „J. Membr. Biol.", *14*, 143.

GARRAHAN, P. J., GLYNN, I. M. (1967), „J. Physiol.", *192*, 217 şi 237.

GEDDES, L. A. (1972), *Electrodes and the Measurement of Bioelectric Events*, cap. 4, Wiley-Interscience, New York.

GEREBTZOFF, M. A., SCHOFFENIELS, E. (1960) în *Comparative Biochemistry*, vol. II, M. FLORKIN (ed.), Academic Press, New York.

GORMAN, A. L. F., MARMOR, M. F. (1970), „J. Physiol.", *210*, 897 şi 919.

GRUNDFEST, H. (1966), „Ann. N. Y. Acad. Sci.", *137*, 901.

HALL, J. E. (1975), „Biophys. J.", *15*, 934.

HANAI, T., HAYDON, D. A., TAYLOR, J. (1965), „J. gen. Physiol.", *48*, 59.

HINKE, J. A. M. (1961), „J. Physiol.", *156*, 314.

HLADKY, S. B., HAYDON, D. A. (1972), „Biochim. Biophys. Acta", *274*, 294.

HODGKIN, A. L., KATZ, B. (1949), „J. Physiol.", *108*, 37.

HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F. (1952), „J. Physiol.", *117*, 500.

HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D. (1955), „J. Physiol.", *128*, 28.

HOSHIKO, T., LINDLEY, B. (1964), „Biochim. Biophys. Acta", *79*, 301.

KEDEM, O. (1961), În *Membrane Transport and Metabolism*, A. KLEINZELLER, A. KOTYK (ed.), Academic Press, New York.

KIDDER III, G. W. (1973), „J. Biol. Physics", *1*, 143.

KLEINZELLER, A., KOSTYUK, P. G., KOTYK, A., LEV, A. A. (1969), În *Laboratory Techniques in Membrane Biophysics*, H. PASSOW şi R. STÄMPFLI (ed.), Springer Verlag, Berlin.

KUFFLER, S. W., NICHOLLS, J. G., ORKLAND, R. K. (1966), „J. Neurophysiol.", *29*, 768.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL III

INFLUXUL NERVOS

Relaţiile complexe dintre organism şi mediul ambiant, ca şi necesitatea funcţionării coordonate a subsistemelor sale impun circulaţia permanentă de informaţie referitoare atît la parametrii mediului extern, cît şi la starea diferitelor sale teritorii. Pe baza acestei informaţii, prelucrată în sistemul nervos central, se elaborează comenzile adresate organelor efectoare. La toate metazoarele, sistemul nervos periferic constituie o amplă reţea de comunicaţie în cadrul organismului, reţea în care semnalele utilizate constau numai din influxuri (impulsuri) nervoase.

Impulsul nervos reprezintă variaţia tranzitorie şi propagabilă a potenţialului de membrană al fibrelor nervoase, adică *potenţialul de acţiune* al acestora, produs de un stimul. Toate celulele vii au capacitatea de a-şi modifica anumiţi parametri caracteristici ca răspuns la acţiunea unor agenţi externi. Pe fondul acestei iritabilităţi generale, în cursul evoluţiei, au apărut celule capabile să răspundă la stimuli externi printr-o degajare bruscă de energie sub forma unei variaţii tranzitorii a potenţialului de membrană de la valoarea negativă de repaus la o valoare pozitivă, variaţie care se propagă pe toată suprafaţa membranei celulare. Acestea sînt celulele excitabile, al căror reprezentant tipic este neuronul. În cazul ţesuturilor formate din celule excitabile, de exemplu un nerv, un stimul dă naştere unei variaţii de potenţial electric ce rezultă din compunerea potenţialelor de acţiune celulare.

Noţiunea modernă de influx nervos a apărut după ce în 1791 L. Galvani a ajuns la concluzia că în mod fiziologic contracţia muşchilor este determinată de un curent electric generat de nervul aferent. Ideea producerii de electricitate de către ţesuturi a fost contestată de către A. Volta, dar după

1840 a fost confirmată în mod indubitabil de către C. Mateucci şi E. DuBois-Reymond. Ei au plasat nervul unui preparat neuromuscular pe un muşchi intact şi au constatat că atunci cînd este produsă contracţia acestui muşchi, se contractă şi muşchiul preparatului.

În 1879, L. Hermann a emis ipoteza, ulterior unanim acceptată, că propagarea excitaţiei pe nerv are loc prin curenţi electrici locali care circulă în mod recurent închizîndu-se prin membrana celulară, prin citoplasmă şi prin lichidul extracelular.

Materialul biologic pe care au fost făcute cercetările asupra influxului nervos l-a reprezentat, pînă în jurul anului 1940, trunchiul nervos în ansamblu, ulterior perfecţionarea aparaturii permiţînd lucrul pe fibre nervoase izolate. Deoarece descifrarea mecanismelor biofizice ale excitaţiei a fost posibilă numai prin studiile făcute pe celule izolate, în special pe axonii giganţi de calmar şi pe fibrele mielinizate din nervul sciatic de broască, vom prezenta mai întîi caracteristicile de excitabilitate la nivel de celulă, iar apoi manifestările care apar la nivelul trunchiului nervos în ansamblu, din compunerea activităţii tuturor fibrelor sale. După o descriere predominant fiziologică a influxului nervos (§ III.1 şi III.2), cea mai mare parte a acestui capitol este dedicată aprofundării problemelor legate de mecanismul generării şi propagării excitaţiei nervoase.

III.1. FENOMENOLOGIA ACTIVITĂŢII ELECTRICE A FIBRELOR NERVOASE

Atunci cînd asupra unei celule excitabile acţionează un stimul, apar modificări ale proprietăţilor sale fizico-chimice, caracteristic fiind faptul că aceste modificări sînt *tranzitorii* în timp şi *se propagă* de la locul de origine pe toată suprafaţa celulei. Stimulii (excitanţii) pot fi de diferite naturi: mecanici, termici, chimici, luminoşi (cap. VI), dar cei mai adecvaţi sînt stimulii electrici, datorită posibilităţii de a li se stabili în mod riguros, comod şi perfect reproductibil toate caracteristicile. Dintre proprietăţile fizico-chimice ale celulelor excitabile care variază în urma stimulării, cele mai evidente sînt manifestările de ordin electric — potenţialele de acţiune. În aceasta rezidă interesul deosebit şi dezvoltarea amplă a electrofiziologiei, domeniu prin care fiziologia a

dat naştere unei game largi de tehnici riguroase de investigaţie clinică şi pe de altă parte a putut avansa către o cunoaştere tot mai aprofundată a mecanismelor funcţionării sistemului nervos.

III.1.1. Metodele microelectrofiziologice de bază

Elementul primordial în orice experienţă de electrofiziologie celulară este măsurarea potenţialului electric transmembranar a cărui valoare staţionară reprezintă potenţialul de repaus celular şi a cărui variaţie produsă de un stimul constituie potenţialul de acţiune.

În subcapitolul II.2., s-a arătat că modalitatea veche de măsurare a potenţialului de repaus ca potenţial de demarcaţie (sau de leziune) între o zonă intactă şi una lezată a unui ţesut nu putea da decît valori foarte aproximative, deoarece între cele două zone circulă curenţi care le scurtcircuitează, ocolind electrozii de culegere şi în general este aproape imposibil ca cei doi electrozi să fie în contact cu o singură celulă. Utilizarea microelectrozilor (§ II.2.1) a înlăturat aceste dificultăţi, deoarece dimensiunile foarte mici ale vîrfului micropipetei (sub 1 μm) permit introducerea chiar a mai multor electrozi în celulele mari, cum sînt axonii nevertebratelor (sau fibrele musculare) fără să le lezeze.

Însă, tocmai valoarea foarte mare a impedanţei face ca microelectrozii să nu fie adecvaţi măsurătorilor de curenţi şi deci de conductivitate. Întrucît proprietăţile de permeabilitate ale membranelor excitabile sînt exprimate din punct de vedere electric prin conductanţa lor, este foarte important ca aceasta să poată fi măsurată în mod adecvat, condiţia esenţială fiind posibilitatea de a menţine pe o suprafaţă membranară mare o valoare constantă a diferenţei de potenţial dintre interior şi exterior.

Favorizaţi de dimensiunile excepţionale ale axonilor giganţi ai cefalopodelor (diametru în jur de 500 μm), K. S. Cole şi G. Marmont au elaborat în 1948 tehnica potenţialului fixat (*clamp-voltage*), cu ajutorul căreia A. L. Hodgkin şi A. F. Huxley au efectuat cercetările care i-au condus la formularea teoriei ionice a excitaţiei. O baghetă de sticlă cu diametrul de 50—70 μm, pe care sînt înfăşurate elicoidal două fire de argint izolate pe toată lungimea cu excepţia unei porţiuni de 1 cm care este clorurată, este introdusă

în interiorul axonului fără ca membrana să fie lezată. În dreptul porţiunii neizolate a firelor interne, în exterior este plasat un electrod mare de argint clorurat care înconjură axonul cît mai aproape posibil de faţa externă a membranei. Între electrodul extern şi unul din firele de argint se poate măsura curentul ce traversează membrana printr-o suprafaţă bine delimitată, în serie cu rezistenţa membranei axonale fiind numai rezistenţe foarte mici (neglijabile), datorate axoplasmei şi lichidului exterior interpuse între electrozi ca şi electrozilor înşişi. Prin celălalt fir intern poate fi aplicat din exterior curentul necesar menţinerii potenţialului de membrană la diferite valori.

În fig. III.1, este prezentată diagrama foarte simplificată a uneia dintre posibilităţile de dispunere a electrozilor şi a sistemului de măsură în cadrul tehnicii potenţialului fixat. Potenţialul transmembranar, măsurat între microelectrodul intern şi cel extern (de referinţă), este comparat de către un amplificator operaţional cu un potenţial constant dat de un generator de impulsuri rectangulare de lungă durată (peste 100 ms). Amplificatorul operaţional trimite prin electrodul axial intern un curent proporţional şi de sens contrar cu diferenţa celor două potenţiale, astfel încît potenţialul transmembranar este menţinut egal cu potenţialul dat de

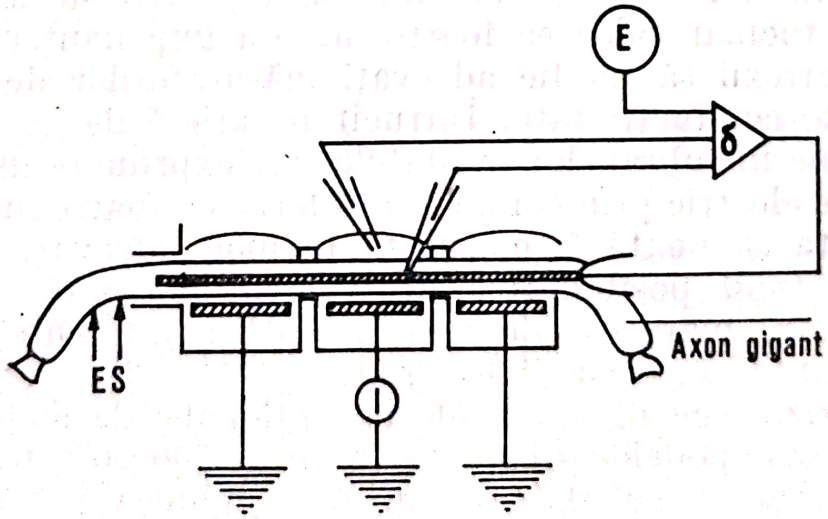


Fig. III.1. (după Cole, 1968) : Schema dispunerii axonului gigant de calmar şi a electrozilor pentru măsurarea curenţilor transmembranari în condiţii de potenţial fixat. *E* — generatorul de impulsuri rectangulare de lungă durată ; δ — amplificatorul operaţional ce trimite prin electrodul axial intern un curent proporţional cu diferenţa între potenţialul transmembranar măsurat cu cei doi microelectrozi şi amplitudinea impulsului dat de *E* ; *I* — sistemul de măsură a curentului transmembranar ; *ES* — electrozii de stimulare.

generator. Electrodul extern median culege curentul care traversează membrana în aceste condiții. În mod curent, se ridică numeroase probleme legate de măsurarea curenților și a potențialelor și există o întreagă gamă de variante experimentale, dar ideea de principiu este cea prezentată anterior.

Un moment important în evoluția tehnicilor de investigare a impulsului nervos l-a reprezentat perfuzia internă a axonului gigant, adică golirea sa de axoplasmă prin „stoarcere" sau prin dislocuirea hidraulică a acesteia. Reușită în 1961, în mod independent, de I. Tasaki și grupul său și de P. F. Baker, A. L. Hodgkin și T. I. Shaw, tehnica perfuziei interne prezintă o dublă importanță, deoarece: a) a arătat că și un axon golit de 95% din axoplasma sa, deci rămas ca un tub de membrană celulară, atunci cînd este perfuzat cu o soluție salină adecvată, poate răspunde la stimuli dînd naștere la potențiale de acțiune identice cu cele din starea normală;

b) a permis să fie modificată la alegere compoziția mediului intern, putîndu-se corela răspunsul electrofiziologic cu efectul substanțelor introduse în mediul de perfuzie.

Redăm în fig. III.2. schema perfuziei interne în varianta utilizată de Tasaki.

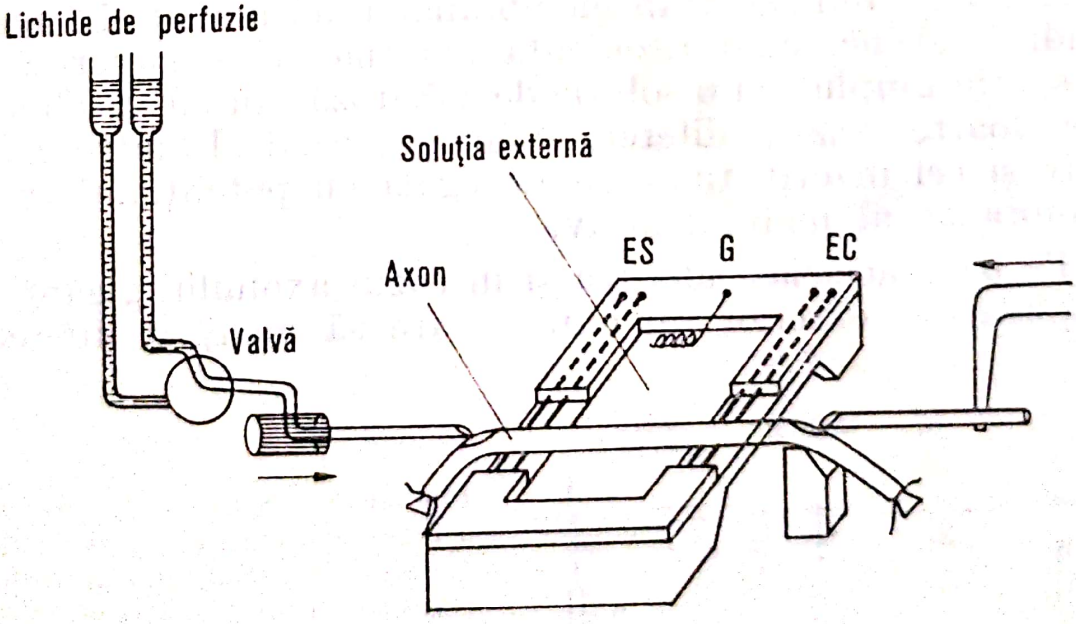


Fig. III.2. (după Tasaki, 1968): Perfuzia internă prin dublă canulare a axonului gigant. Axoplasma este dislocuită datorită presiunii hidrostatice a lichidului de perfuzie, iar valva permite alternarea rapidă a celor două lichide de perfuzie. *ES* — electrozi de stimulare; *G* — electrod de referință; *EC* — electrozi de culegere. Săgețile indică deplasarea cu micromanipulatoare a celor două canule.

Explicaţia generării şi propagării influxului nervos prin variaţii specifice ale permeabilităţii membranei axonale pentru sodiu şi potasiu — adică teoria ionică a excitaţiei (III.3). — a fost formulată de Hodgkin şi Huxley pe baza rezultatelor obţinute cu axonul gigant de calmar. Totuşi, această fibră nervoasă este de un tip cu totul particular, am putea spune „exotic", aşa încît pentru a se putea verifica valabilitatea generală a mecanismelor ionice ale excitaţiei şi, în general, pentru a se studia propagarea impulsului în fibrele nervoase cele mai caracteristice vertebratelor, au fost elaborate tehnici de înregistrare de pe fibre nervoase mielinizate.

Date fiind dimensiunile reduse ale acestor fibre (diametru în jur de 10 μm) şi prezenţa tecii de mielină care nu lasă expuse decît nodurile Ranvier cu lărgime în jur de 1 μm, este practic imposibil ca microelectrozii de sticlă să fie utilizaţi pentru înregistrări intracelulare. După 1950, R. Stämpfli şi A. F. Huxley au pus la punct cîteva metode de înregistrare extracelulară a potenţialului de membrană al nodului Ranvier. Principiul unei astfel de determinări este schematizat în fig. III.3. Fibra izolată, căreia i s-au evidenţiat trei noduri Ranvier, este plasată într-o cameră din plexiglas construită astfel încît fiecare nod să stea într-un compartiment separat. Unul din noduri este inactivat, prin depolarizare cu KCl, potenţialul său transmembranar fiind anulat. În aceste condiţii, atunci cînd rezistenţa externă R_e — asigurată de un spaţiu umplut cu o soluţie de zaharoză sau cu vaselină — este foarte mare, diferenţa de potenţial V între nodul activ şi cel inactiv tinde să fie egală cu potenţialul transmembranar al nodului activ.

Pe baza aceleiaşi idei (ca şi în cazul axonului gigant) de a aplica din exterior un curent care să menţină diferenţa

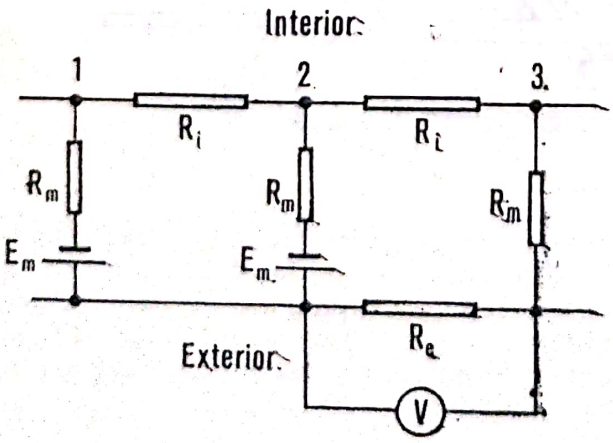


Fig. III.3. : Schema de principiu a măsurării extracelulare a potenţialului de membrană al nodului Ranvier. Aparatul de măsură (V) detectează căderea de potenţial pe rezistenţa externă mare R_e, între nodul 2 intact şi nodul 3, depolarizat. R_i — rezistenţa axoplasmei ; R_m — rezistenţa membranei nodului Ranvier ; E_m — potenţialul transmembranar.

de potenţial dintre un nod activ şi unul inactivat la o valoare impusă prin compararea cu un impuls rectangular, B. Frankenhaeuser şi colaboratori ai săi au elaborat, după 1957, tehnica potenţialului fixat pentru fibre mielinizate. Datorită izolării sale naturale în ambele părţi laterale de către tecile de mielină, nodul Ranvier se pretează mult mai bine decît fibrele nemielinizate la menţinerea constantă a potenţialului şi a densităţii de curent printr-o suprafaţă membranară bine definită. Pe de altă parte însă, lucrul experimental cu un material biologic atît de gracil este foarte laborios. Pentru a ilustra caracterul miniatural şi deci dificultăţile considerabile întîmpinate chiar numai în ceea ce priveşte manipularea fibrelor nervoase mielinizate, redăm în fig. III.4. camera în care sînt plasate fibrele pentru înregistrări.

În afara axonului gigant de calmar şi a fibrelor mielinizate de broască, cercetările de electrofiziologie celulară referitoare la mecanismele impulsului nervos se fac şi pe axonii mari ai crustaceelor (cu diametre în jur de 100 μm), pe fibre

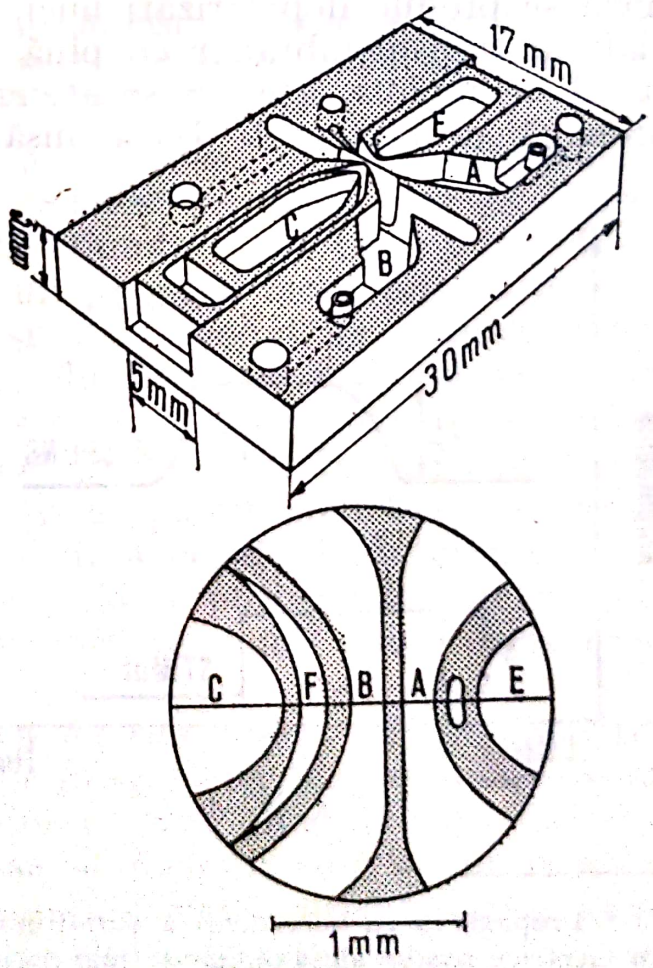


Fig. III.4. : Incinta multicompartimentală în care este plasată fibra mielinizată pentru înregistrări în condiţii de potenţial fixat.

mielinizate de mamifere, ca şi pe neuroni din centrii nervoşi (de exemplu de melc).

III.1.2. Potenţiale locale şi propagate

Atunci cînd un stimul acţionează asupra dendritelor sau a somei neuronale, se produce o variaţie locală a potenţialului transmembranar, amplitudinea acestei variaţii de potenţial fiind proporţională—direct sau logaritmic—cu mărimea stimulului care a produs-o. Aşa este situaţia în cazul potenţialelor induse de mediatorii chimici în membranele postsinaptice (cap. V) sau a potenţialelor gradate care apar în neuronii senzitivi (cap. VI) (fig. III.5).

Potenţialele locale se propagă pe suprafaţa membranelor excitabile datorită proprietăţilor electrice pasive ale acestor membrane, dar propagarea se face decremental*, amplitudinea scăzînd în mod exponenţial cu distanţa faţă de locul de origine al potenţialului (fig. III.5).

Şi în cazul axonilor, de exemplu al unui axon gigant, dacă se produc depolarizări mici, adică reduceri ale potenţialului transmembranar cu pînă la 15 mV faţă de potenţialul de repaus, acestea se atenuează rapid în timp şi se propagă decremental. Dacă însă depolarizarea depăşeşte

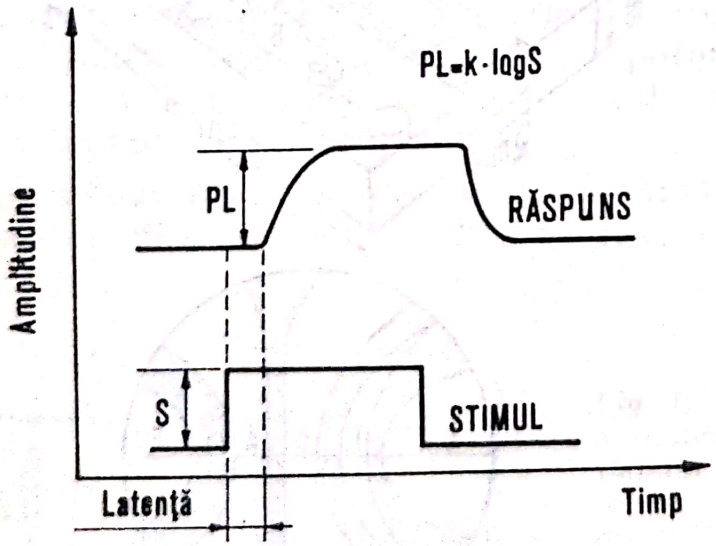


Fig. III.5. : Caracteristicile unei variaţii locale a potenţialului de membrană, indusă de un stimul electric rectangular.

* Propagarea cu decrement a variaţiilor de potenţial datorită proprietăţilor electrice pasive ale axonilor se mai numeşte şi *propagare electrotonică*.

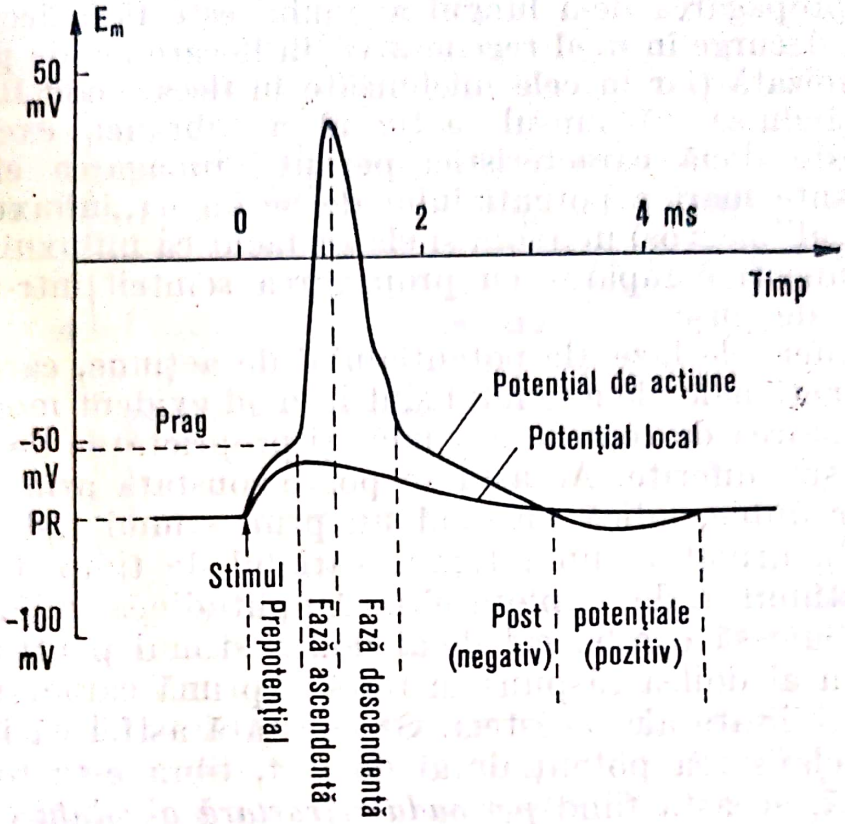


Fig. III.6. : Comparaţie între un potenţial local şi un potenţial de acţiune. Sînt reprezentate toate fazele unui potenţial de acţiune tipic, de exemplu în axonul gigant.

o anumită valoare critică, de *prag*, atunci se declanşează *potenţialul de vîrf* (*spike*) al fibrei nervoase, care este un răspuns activ al acesteia la stimulul care l-a produs. În fig. III.6, sînt schematizate un *potenţial local*, produs de o depolarizare subliminară, şi un *potenţial de acţiune* complet al unei fibre nervoase mielinizate. Se vede că prima fază a potenţialului de acţiune este tot un potenţial de tip local, gradat, numit *prepotenţial*. Potenţialul de vîrf care survine după acesta este o variaţie amplă şi rapidă a potenţialului transmembranar de la valoarea negativă a interiorului fibrei faţă de exterior pînă la o valoare pozitivă de cîteva zeci de milivolţi. Potenţialul de vîrf prezintă două caracteristici distinctive de bază :

1) decurge după legea *tot sau nimic*, adică orice stimul care depăşeşte valoarea de prag dă naştere aceluiaşi răspuns, amplitudinea potenţialului de vîrf fiind o caracteristică a respectivei fibre nervoase şi nedepinzînd de mărimea stimulului, cu condiţia ca acesta să depăşească valoarea de prag (care este şi ea o caracteristică a fibrei) ;

2) propagarea de-a lungul axonului este fără decrement căci ea decurge în mod regenerativ, în fiecare loc de pe fibra nemielinizată (iar în cele mielinizate în fiecare nod Ranvier) declanşîndu-se răspunsul activ al membranei excitabile.

Aceste două caracteristici permit propagarea eficientă la distanţe mari a potenţialului de acţiune („influxul" sau „impulsul" nervos) în axoni şi ele au făcut ca influxul nervos să fie uneori comparat cu propagarea scînteii într-un fitil cu praf de puşcă.

În diferitele faze ale potenţialului de acţiune, caracteristicile funcţionale ale axonului sînt în mod evident modificate faţă de starea de repaus, aşa încît şi proprietăţile de excitabilitate sînt diferite. Aceasta se poate constata prin metoda şocurilor duble, adică aplicînd un prim stimul („de condiţionare"), urmat la un interval variabil de timp de un al doilea stimul („de explorare"). Amplitudinea minimă pe care trebuie să o aibă cel de-al doilea stimul pentru a declanşa un al doilea răspuns în fibră exprimă caracteristicile de excitabilitate ale acesteia. Se constată astfel că imediat după declanşarea potenţialului de vîrf, fibra este total inexcitabilă, aceasta fiind *perioada refractară absolută* ce coincide cu faza ascendentă şi începutul fazei descendente a potenţialului de vîrf. Urmează apoi o *perioadă refractară relativă*, în care excitabilitatea este mult redusă, dar se poate totuşi produce un răspuns al fibrei la stimulul explorator. Durata acestei perioade este variabilă, în cazul fibrelor mielinizate coincizînd cu sfîrşitul fazei descendente a potenţialului de vîrf şi debutul postpotenţialului negativ. Uneori, după aceste faze de hipoexcitabilitate urmează o fază de hiperexcitabilitate în timpul postpotenţialului negativ şi încă o fază de hipoexcitabilitate în timpul postpotenţialului pozitiv. Amplitudinea potenţialului de vîrf produs în timpul perioadei refractare relative este mai mică decît cea normală, acest fapt nefiind o contrazicere a legii „tot sau nimic", căci fibra nu este într-o stare comparabilă cu aceea anterioară excitaţiei.

Un fenomen foarte important este *acomodarea* — creşterea pragului de excitabilitate a fibrelor nervoase atunci cînd asupra lor acţionează un stimul de durată. Această creştere poate fi rapidă, ca în cazul fibrelor din nervii motori, sau lentă, aşa cum este la unele fibre senzitive. Pe baza creşterii pragului de excitabilitate faţă de stimuli prelungiţi, se poate înţelege modul în care astfel de stimuli dau naştere

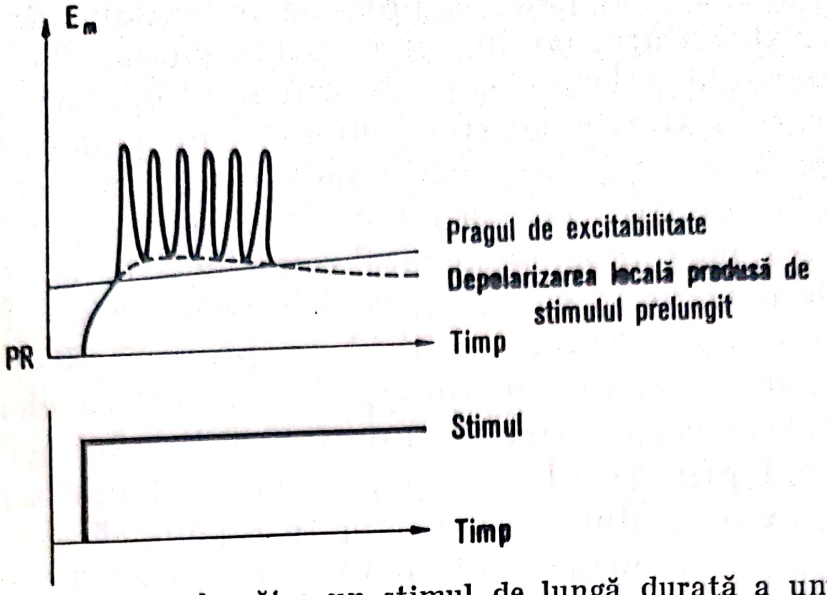


Fig. III.7. : Inducerea de către un stimul de lungă durată a unui răspuns oscilatoriu, succesiunea de potenţiale de acţiune durînd atîta timp cît depolarizarea locală este superioară pragului de excitabilitate.

la o succesiune de potenţiale de vîrf (fig. III.7). Atîta timp cît valoarea depolarizării locale produse de către stimulul prelungit rămîne superioară pragului de excitabilitate după perioada refractară a unui prim potenţial de vîrf se va produce un al doilea ş.a.m.d., astfel încît la stimulul continuu, fibra prezintă un *răspuns repetitiv* sau oscilatoriu. E. D. Adrian a stabilit că — între anumite domenii de valori — frecvenţa de repetiţie a potenţialelor de vîrf este proporţională cu logaritmul intensităţii stimulului (§ VI.3.1).

Aşa cum am menţionat anterior, pe dendrite şi pe soma neuronală iau naştere potenţiale locale ce se propagă cu decrement pînă la gîtul sau conul axonal. Amplitudinea totală rezultată în acest loc din însumarea potenţialelor locale provenite din diferite puncte constituie stimulul care declanşează în axon un răspuns repetitiv, adică o succesiune de potenţiale de acţiune de aceeaşi amplitudine. În aceasta constă procesul de codificare în frecvenţă a amplitudinii stimulilor, etapă esenţială a transmiterii informaţiei prin canalul neuronal.

III.1.3. Propagarea recurentă şi saltatorie în fibrele nervoase

Asemenea oricărei celule şi într-o fibră nervoasă în stare de repaus distribuţia de sarcini electrice este astfel încît interiorul (axoplasma) este negativ faţă de exterior (lichidul

interstiţial). Atunci cînd se produce potenţialul de acţiune are loc o deplasare, iar în cursul potenţialului de vîrf chiar o inversare de polaritate, exteriorul devenind negativ faţă de interior. Datorită acestei schimbări de polarizare, între zona activă şi zonele învecinate ale fibrei iau naştere curenţi electrici locali (fig. III.8.a.) care depolarizează membrana axonală în porţiunile adiacente zonei active, acţionînd ca stimul de declanşare a excitaţiei şi în aceste zone. În fibrele nervoase nemielinizate, impulsul se propagă deci în mod recurent, din aproape în aproape, prin curenţi electrici locali ce traversează întreaga suprafaţă a membranei axonale şi se închid prin axoplasmă şi prin lichidul interstiţial, circulînd în exterior dinspre regiunile în repaus către porţiunea activă a fibrei, iar prin axoplasmă în sens invers. Ideea acestui tip de propagare recurentă a fost formulată încă din 1870 de către L. Hermann, valabilitatea ei putînd fi dovedită prin experienţe foarte simple şi concludente. Astfel, dacă se secţionează sau se narcotizează o porţiune a unei fibre nervoase, dar se stabileşte contact metalic între porţiunile intacte învecinate, impulsul nervos se poate propaga între acestea, peste zona lezată care nu mai conduce. De asemenea, se constată că plasînd o fibră în ulei, aşa încît rezistenţa electrică a mediului extern creşte, deoarece rămîne doar o peliculă subţire de lichid bun conducător de electricitate în jurul fibrei, viteza de conducere a impulsului scade. Invers, într-un mediu cu conductibilitate electrică mare creşte şi viteza de conducere.

Fibrele nervoase mielinizate au o structură net diferită faţă de cele nemielinizate, suprafaţa lor fiind acoperită cu o teacă de mielină groasă de aproximativ 2 μm (diametrul propriu-zis al fibrei fiind de ordinul a 10 μm) care izolează axonul de lichidul extracelular, contactul fiind numai la

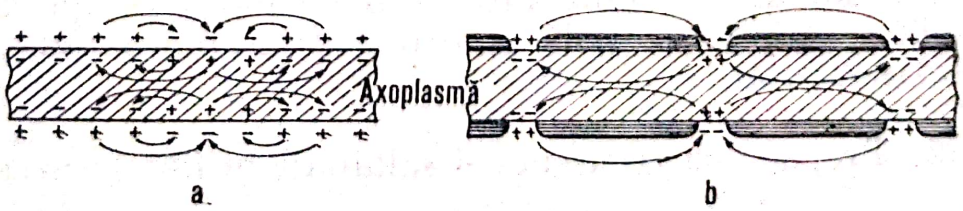


Fig. III.8. : Propagarea excitaţiei prin curenţii locali, în mod recurent într-un axon nemielinizat (*a*) şi saltatoriu (între nodurile Ranvier) într-un axon mielinizat (*b*).

nodurile Ranvier unde teaca de mielină se întrerupe. Teaca de mielină constă din aproximativ 200 de membrane celulare suprapuse, provenind din răsucirea unei celule Schwann în jurul axonului (fig. III.9.). Datorită compoziţiei sale lipidice, mielina acţionează ca un izolator electric, aşa încît prin toată porţiunea acoperită cu mielină (internodul), lungă de 1—2 mm, curenţii nu pot traversa membrana axonală, ei putînd trece numai prin zona nodului ce are o lărgime de pînă la 1 μm.

În cazul fibrelor mielinizate, curenţii locali nu mai traversează toată suprafaţa membranei axonale, ci „sar" de la un nod Ranvier la altul închizîndu-se prin axoplasmă şi lichidul extracelular (fig. III.8.b.). De fapt, între fibră şi teaca de mielină este un spaţiu larg de ≈100 Å, dar rezistenţa sa electrică este atît de mare faţă de exterior, încît derivaţia de curent prin acest spaţiu este neglijabilă. Ideea conducerii saltatorii a fost sugerată de R. Lillie în 1925 şi confirmată apoi experimental de G. Kato, I. Tasaki şi colaboratorii săi şi de A. F. Huxley şi R. Stämpfli. Dintre cele mai evidente dovezi ale conducerii saltatorii menţionăm faptul că narcotizarea internodului nu blochează propagarea impulsului, în timp ce narcotizarea nodului îl opreşte, ca şi demonstrarea traversării membranei axonale de către curent numai în zona nodului.

Referitor la sensul de propagare al excitaţiei, se observă că atît în axonii nemielinizaţi, cît şi în cei mielinizaţi conducerea impulsului are loc bidirecţional, atît ortodromic (de la dendrite către butonii sinaptici ai axonului), cît şi antidromic. Unidirecţionalitatea fiziologică de propagare exclusiv ortodromică este asigurată de sinapse, care funcţionează ca „valve" ce asigură sensul unic de circulaţie a influxului nervos.

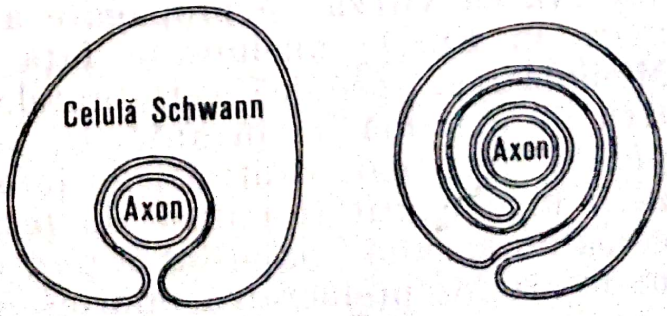


Fig. III.9. : Formarea tecii de mielină prin răsucirea progresivă a unei celule Schwann în jurul axonului. Teaca de mielină rezultă din suprapunerea membranelor celulare dintre care citoplasma s-a retras.

III.1.4. Viteza de conducere a impulsului nervos

Între momentul aplicării unui stimul pe fibra nervoasă şi acela al apariţiei potenţialului de acţiune la o anumită distanţă faţă de locul stimulării este un interval de *latenţă*, proporţional cu distanţa dintre cele două puncte. În mod evident, latenţa L reprezintă timpul necesar pentru propagarea excitaţiei pe distanţa l dintre locul de stimulare şi cel de culegere, pe baza cunoaşterii acestora putîndu-se calcula viteza de propagare :

$$Ø = l/L.$$

În mod experimental s-a constatat, iar pe baza circuitelor electrice echivalente ale membranei axonale (III.3) se poate demonstra, că atît în cazul fibrelor nemielinizate, cît şi al celor mielinizate, viteza de conducere variază direct proporţional cu diametrul fibrei (mai exact cu o putere subunitară a diametrului). Pentru a ilustra ordinul de mărime, în tabelul III.1 sînt incluse diametrele şi vitezele de conducere pentru diferite fibre nervoase. Din acest tabel se

TABELUL III.1.

Viteza de conducere a influxului nervos (ø) în fibre de diferite diametre (*D*) la temperatura de 20°C (date citate de Mărgineanu, 1972)

Animalul	Tipul de fibră	*D* (μm)	ø (m/s)
Pisică	Nemielinizată	0,5	0,53
Iepure	Nemielinizată	1,2	0,51
Pisică	Mielinizată	7	22,60
X. laevis	Mielinizată	12	21,60
X. laevis	Mielinizată	30	67,70

observă că viteza de propagare a excitaţiei este mult mai mare în fibrele mielinizate faţă de fibrele nemielinizate. Mielinizarea, specifică vertebratelor, este o achiziţie evolutivă de maximă importanţă, ea permiţînd transmiterea rapidă a unei mari cantităţi de informaţie în condiţiile utilizării unei cantităţi reduse de ţesut nervos pentru conducerea impulsului (majoritatea ţesutului nervos fiind în centrii unde are loc prelucrarea informaţiei). Astfel, pentru aceeaşi

viteză de conducere, o fibră mielinizată de broască are un diametru de 60 × mai mic decît al axonului gigant de calmar, avînd pentru aceeaşi lungime un volum de 3600 × mai mic.

Markin şi Pastuşenko (1969) au studiat în mod teoretic propagarea excitaţiei în axoni al căror diametru nu este constant, ci se modifică brusc într-un anumit punct. Ei au obţinut relaţii care dau variaţia vitezei de propagare în aceste puncte, arătînd şi condiţiile în care este posibilă chiar blocarea conducerii la o astfel de schimbare a diametrului fibrei.

În funcţie de vitezele de conducere (şi deci de diametru) se disting mai multe tipuri de fibre. Astfel, la mamifere sînt :

— fibrele A : mielinizate, cu diametre între 1 şi 22 μm şi viteze de conducere între 5 şi 120 m/s ;

— fibrele B : mielinizate, cu diametre mai mici de 3 μm şi viteze între 5 şi 15 m/s ; sînt axoni preganglionari eferenţi care se găsesc în nervii autonomi ;

— fibrele C : nemielinizate, cu diametre între 0,3 şi 1,3 μm şi viteze de conducere între 0,6 şi 2,3 m/s ; sînt fie axoni postganglionari eferenţi din sistemul simpatic (grupul s.C.), fie axoni aferenţi din rădăcinile dorsale (d.r.C.)

Viteza de conducere a impulsului nervos este puternic afectată de temperatură, avînd în general $Q_{10} \approx 3$, deci triplîndu-se pentru o creştere a temperaturii cu 10°. Această dependenţă marcată de temperatură pare să sugereze participarea unor fenomene chimice (metabolice) în procesul de propagare a excitaţiei, contrar teoriei ionice a excitaţiei (III.6.), dar este foarte probabil să poată fi interpretată şi în cadrul conceptual al acestei teorii.

III.2. FENOMENOLOGIA ACTIVITĂŢII ELECTRICE A TRUNCHIULUI NERVOS

Imaginea actuală asupra impulsului nervos a rezultat din cercetările efectuate pe axonul gigant de calmar (al cărui diametru foarte mare (~ 500 μm) a permis, după metafora lui K. S. Cole, „introducerea unui întreg laborator în interiorul său") şi pe fibre izolate din nervul sciatic al broaştei africane *Xenopus laevis*. Dar axonul gigant al calmarului a devenit material de studiu abia după ce în 1936 J. Z. Young

l-a relevat atenţiei fiziologilor, iar disecţia şi lucrul pe fibre mielinizate izolate au fost începute de şcoala lui G. Kato după 1930 şi perfecţionate de R. Stämpfli şi A. F. Huxley în jurul anului 1950.

Anterior acestor posibilităţi de lucru pe axoni unici, electrofiziologia impulsului nervos utiliza drept material de studiu trunchiul nervos în ansamblu, în special nervul sciatic de broască, constînd din sute pînă la mii de fibre de diferite diametre. Trunchiul nervos, eventual cu teaca conjunctivă îndepărtată, mai este folosit şi în prezent drept model experimental, în special în cercetări farmacologice.

Din punctul de vedere al tipului de răspuns, între fibră şi trunchiul nervos este o deosebire esenţială: în timp ce potenţialul de vîrf al unei fibre este independent de valoarea stimulului dacă acesta depăşeşte pragul de excitaţie (legea „tot sau nimic"), răspunsul electric al trunchiului nervos este *gradat*, fiind un potenţial de acţiune compus, rezultat din însumarea potenţialelor de acţiune celulare ale acelor fibre pentru care a fost depăşit pragul de excitaţie.

Fiind alcătuiţi din fibre în care viteza de conducere a excitaţiei este variabilă (în funcţie de diametru), potenţialele de acţiune compuse ale nervilor prezintă o anumită dispersie spaţială prin comparaţie cu potenţialele de acţiune individuale ale fiecărei fibre. Dispersia devine cu atît mai evidentă, cu cît înregistrarea este la o distanţă mai mare faţă de locul de stimulare a nervului. În fig. III.10, este arătat aspectul nervogramei înregistrate de pe un nerv sciatic la diferite distanţe de locul de stimulare. În apropierea punctului de stimulare apare o singură undă care în realitate constă din două componente (α şi β) care se disting cu atît mai bine cu cît culegerea se face la o distanţă mai mare.

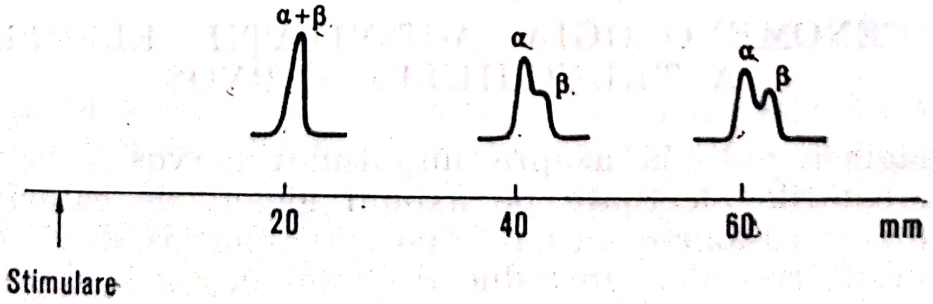


Fig. III.10.: Aspectul potenţialului de acţiune compus dat de fibrele de tip A din nervul sciatic de broască. Pe abscisă este indicată distanţa dintre locul de stimulare şi cel de culegere.

Cu cît viteza de conducere este mai mare, cu atît fibra nervoasă respectivă este mai excitabilă, pragul ei de răspuns fiind mai scăzut. De aceea, pe măsură ce intensitatea stimulului crește progresiv apar diferitele componente α, β, γ etc.,care contribuie la potențialul de acțiune compus al trunchiului nervos. Corelația dintre viteza de propagare a excitației și diametrul axonului le-a permis lui H. Gasser și H. Grundfest să reconstituie în mod grafic potențialul de acțiune al unui nerv pe baza cunoașterii histologice a numărului de fibre de diferite diametre din respectivul nerv.

Caracterul gradat al răspunsului electric al trunchiului nervos face ca în cazul acestuia să nu mai aibă semnificație noțiunea de „prag de excitație", ci să se vorbească despre stimuli liminari, capabili să producă cel mai mic răspuns sesizabil al nervului. În cazul pulsurilor de curent „în treaptă" (fig. III.11.a), G. Weiss a stabilit o relație aproximativă între intensitatea (I) și durata (τ) stimulilor care produc răspunsul minim. Această relație este de tip hiperbolic (fig. III.11.b):

$$I = I_0 + \frac{q}{\tau}, \text{ (I_0 și q fiind constante).}$$

Pe baza legii lui Weiss, se definesc parametrii electrofiziologici uzuali ce caracterizează excitabilitatea nervului:

— *Reobaza* (I_0) este intensitatea minimă pe care trebuie să o aibă un stimul de durată oricît de mare pentru a determina un răspuns electric al nervului;

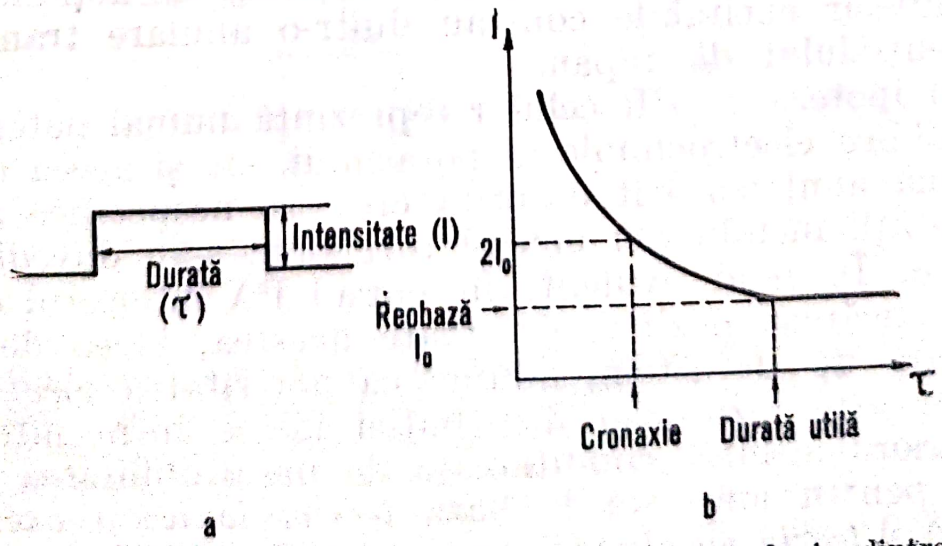


Fig. III.11.: a) Stimul electric „în treaptă"; *b*) Dependența dintre intensitatea și durata stimulilor liminari și parametrii excitabilității nervului.

— *Durata utilă* este valoarea finită începînd de la care stimulul se comportă ca şi cum ar fi infinit, adică intensitatea liminară devine egală cu reobaza şi apoi rămîne constantă;

— Deoarece durata utilă nu poate fi determinată precis, L. Lapicque a introdus ca parametru practic de timp *cronaxia*, reprezentînd durata unui stimul liminar ce are intensitatea cît dublul reobazei.

III.3. CURENŢII ELECTRICI IMPLICAŢI ÎN PROPAGAREA INFLUXULUI NERVOS (TEORIA IONICĂ A EXCITAŢIEI)

În 1902 şi 1912, J. Bernstein a publicat două lucrări în care a aplicat studiul termodinamic al pilelor de concentraţie la descrierea biopotenţialelor. Remarcînd diferenţele mari de concentraţii ionice dintre citoplasma celulelor vii şi lichidul interstiţial şi considerînd că membrana celulară este permeabilă în mod selectiv numai pentru potasiu, el a afirmat că potenţialul de repaus (PR), prezent la toate celulele, este potenţialul unei pile de concentraţie a potasiului.

În ceea ce priveşte impulsul nervos, Bernstein a afirmat că stimulii determină o creştere bruscă şi tranzitorie a permeabilităţii membranei pentru toţi ionii, aşa încît potenţialul de membrană se anulează. El considera deci că impulsul nervos şi, în general, potenţialele de acţiune (PA) ale celulelor excitabile constau dintr-o anulare tranzitorie a potenţialului de repaus.

Atît ipoteza că PR celular reprezintă numai potenţialul de echilibru electrochimic al potasiului, cît şi aceea că PA înseamnă anularea PR datorită creşterii nespecifice a permeabilităţii membranei pentru toţi ionii, s-au dovedit a fi inexacte. În mod evident, în cursul PA interiorul celulei devine încărcat pozitiv. Cu toate acestea, ideea de bază formulată de Bernstein, anume că activitatea electrică a celulelor este rezultatul distribuţiei ionice între interiorul şi exteriorul celulei, condiţionată de permeabilitatea membranei pentru ioni, stă la baza *teoriei ionice* a excitaţiei (numită şi *teoria membranei*) care a reuşit să explice cu mare acurateţe datele electrofiziologice. Dezvoltată în special prin

lucrările lui A. L. Hodgkin și A. F. Huxley asupra axonului gigant de calmar, teoria ionică a excitației constituie unul din fundamentele neurofiziologiei contemporane.

III.3.1. Propagarea electrotonică (pasivă) a semnalelor electrice în membrana celulară; proprietățile de cablu ale membranei

Orice membrană celulară, care separă citoplasma de mediul extracelular, reprezintă din punct de vedere electric o capacitate cu scurgeri, adică o rezistență R_m și o capacitate C_m dispuse în paralel, prin intermediul cărora se face conexiunea între rezistența externă R_e și cea internă R_i (fig. III.12). Circuitul echivalent reprezentat în fig. III.12 este cu constante concentrate, adică R_m și C_m sînt în cazul unei membrane axonale rezistența și capacitatea unității de lungime a axonului, deși în realitate aceste caracteristici electrice sînt distribuite în mod uniform pe toată suprafața membranei.

Dacă, față de valoarea de repaus a potențialului transmembranar, într-un anumit punct al membranei este aplicată o diferență de potențial electric, numit potențial electrotonic, acesta se va propaga pe o zonă a membranei într-un mod determinat de caracteristicile circuitului electric respectiv. Această propagare a semnalelor electrotonice este

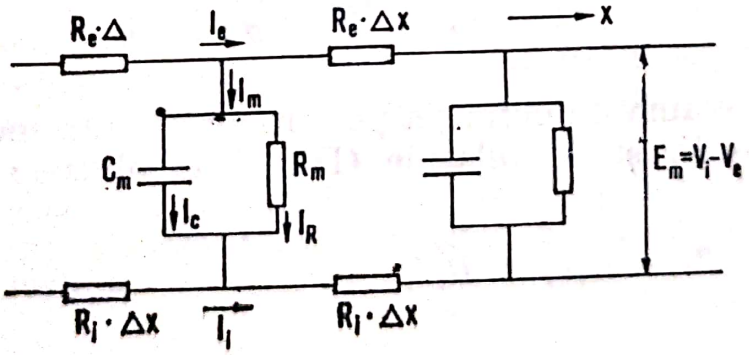


Fig. III.12. : Circuitul electric echivalent reprezentînd caracteristicile electrice pasive ale unei celule lungi, în particular ale unui axon; I_e și I_i sînt curenții longitudinali prin exterior și respectiv prin interior; I_m este curentul transmembranar constînd din componenta capacitivă I_C și cea rezistivă I_R; R_e — rezistența mediului extern și R_i — rezistența citoplasmei, ambele raportate la unitatea de lungime; C_m și R_m sînt capacitatea și respectiv rezistența unității de suprafață membranară; E_m — diferența de potențial între interiorul (V_i) și exteriorul (V_e) celulei.

pasivă, în sensul că nu depinde de proprietăţile de excitabilitate ale membranei, fiind proprie tuturor celulelor, nu numai celor excitabile. În mod evident însă, această problemă este importantă pentru axoni, căci propagarea influxului nervos implică drept o etapă preliminară, înaintea declanşării excitaţiei, transmiterea de tip electrotonic a variaţiilor de potenţial electric membranar.

Pentru a simplifica descrierea propagării electrotonice într-un axon cilindric lung, admitem următoarele ipoteze simplificatoare: a) orice variaţie de potenţial se suprapune liniar peste potenţialul de repaus, aşa că valoarea acestuia poate fi ignorată; b) rezistenţele R_m, R_e şi R_i sînt constante în timp şi nu depind de potenţialul electric; c) întregul sistem prezintă simetrie radială, astfel încît nu intervine decît propagarea longitudinală a semnalelor electrice, de-a lungul axei x.

Aplicînd legea lui Ohm pentru variaţiile de potenţial din mediul extracelular şi din axoplasmă, rezultă:

$$\frac{\partial V_e}{\partial x} = R_e I_e \; ; \quad \frac{\partial V_i}{\partial x} = R_i I_i . \qquad \text{(III.1.)}$$

Legea lui Kirchhoff, care spune că suma tuturor curenţilor dintr-un nod al unui circuit este zero, implică:

$$-\frac{\partial I_e}{\partial x} = I_m = \frac{\partial I_i}{\partial x} . \qquad \text{(III.2.)}$$

Ţinînd seama de definiţia potenţialului transmembranar: $E_m = V_i - V_e$ şi de relaţiile (III.1.) se obţine:

$$\frac{\partial E_m}{\partial x} = R_i I_i - R_e I_e \qquad \text{şi deci:}$$

$$\frac{\partial^2 E_m}{\partial x^2} = R_i \frac{\partial I_i}{\partial x} - R_e \frac{\partial I_e}{\partial x} ,$$ ceea ce pe baza relaţiilor (III.2.) devine:

$$\frac{\partial^2 E_m}{\partial x^2} = I_m (R_i + R_e). \qquad \text{(III.3.)}$$

Curentul total I_m care traversează membrana axonală constă din curentul capacitiv $I_C = C_m \frac{\partial E_m}{\partial t}$ și din curentul rezistiv datorat fluxurilor ionice prin rezistența membranei: $I_R = \frac{E_m}{R_m}$. Introducînd acestea în relația (III.3.) obținem o ecuație cu derivate parțiale pentru variația în timp și cu distanța a potențialului electrotonic de membrană:

$$\frac{\partial^2 E_m}{\partial x^2} = \left(C_m \frac{\partial E_m}{\partial t} + \frac{E_m}{R_m}\right)(R_i + R_e).$$

Această ecuație poate fi scrisă sub forma:

$$-\lambda^2 \frac{\partial^2 E_m}{\partial x^2} + \tau \frac{\partial E_m}{\partial t} + E_m = 0, \qquad \text{(III.4.)}$$

în care: $\lambda^2 = R_m/(R_i + R_e)$ și $\tau = R_m \cdot C_m$.

Soluția generală a ecuației (III.4.) depinde de condițiile la limite impuse, o soluție simplă independentă de timp fiind:

$$E_m(x) = E_m(0) \exp(-x/\lambda). \qquad \text{(III.5.)}$$

Aceasta arată că o variație de potențial electrotonic E_m aplicată într-un punct oarecare $x = 0$ al unui axon va scădea exponențial cu distanța x, fiind atenuată de e (baza logaritmilor naturali, $\approx 2{,}71$) ori la o distanță: $\lambda = \sqrt{R_m/(R_i + R_e)}$, numită *constantă spațială sau de lungime* a axonului (fig. III.13). Constanta de lungime poate fi exprimată în

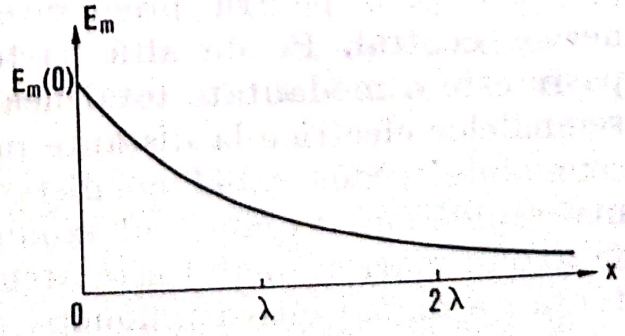


Fig. III.13.: Scăderea exponențială a unei variații locale a potențialului de membrană în funcție de distanța x de la punctul de origine.

funcţie de parametrii ce caracterizează în mod direct fibra nervoasă, ţinînd seama că :

1) $R_m = \frac{r_m}{\pi d}$, r_m fiind rezistenţa specifică a unităţii de suprafaţă membranară, iar d fiind diametrul axonului.

2) $R_i = \frac{r_i}{\frac{\pi d^2}{4}}$, unde r_i este rezistivitatea unităţii de volum de axoplasmă.

Deoarece rezistenţa axoplasmei este mult mai mare decît a lichidului extracelular, se poate admite : $\lambda \approx \sqrt{R_m/R_i} = \sqrt{r_m d/4r_i}$. Această relaţie permite compararea constantelor de lungime a fibrelor nervoase cu caracteristici diferite. Astfel, pentru o fibră nemielinizată de vertebrate, cu diametrul de 1 μm : $\lambda = 330$ μm, pentru axonii mari de crustacee : $\lambda \approx 2{,}5$ mm iar pentru axonul gigant de calmar $\lambda \approx 5$ mm.

Această analiză a propagării electronice pasive a variaţiilor de potenţial prin membrana axonală reprezintă transpunerea specifică pentru această problemă fiziologică a teoriei lui Kelvin asupra propagării semnalelor electrice printr-un cablu telegrafic submarin, prin a cărui izolaţie există scurgeri (Taylor, 1963). Principala concluzie a acestei analize este că membrana oricărei celule propagă pasiv variaţiile de potenţial, astfel încît într-un anumit punct de pe membrană se pot însuma perturbaţiile provenind din diferite puncte de pe suprafaţa celulei. Proprietăţile de cablu ale neuronilor constituie deci baza biofizică a proceselor integrative de sumaţie spaţială a semnalelor electrice, procese esenţiale pentru prelucrarea informaţiei în sistemul nervos central. Pe de altă parte însă, conducerea de tip pasiv este o modalitate total neadecvată pentru propagarea semnalelor electrice la distanţe mari, deoarece amplitudinea semnalului scade rapid cu distanţa, scăderea fiind cu atît mai rapidă cu cît diametrul axonului este mai mic, dar chiar în axonii mari semnalul este atenuat practic total la o distanţă de numai cîţiva milimetri de punctul său de origine.

III.3.2. Propagarea regenerativă (activă) a semnalelor în membranele excitabile; ecuaţiile Hodgkin-Huxley

Propagarea cu decrement a semnalelor electrice datorită numai proprietăţilor electrice pasive ale oricăror membrane celulare este completată în cazul celulelor excitabile de un mecanism activ prin care orice semnal electric care depăşeşte pragul de excitare declanşează o variaţie specifică a permeabilităţilor ionice ale membranei, care face ca în fiecare punct al membranei variaţia de potenţial transmembranar să atingă valoarea de vîrf a potenţialului de acţiune. Rezultatul este o propagare regenerativă a semnalului electric, fără decrement cu distanţa, de tipul propagării unei scîntei într-un fitil din praf de puşcă.

Natura procesului regenerativ prin care o anumită depolarizare a membranei este amplificată a fost înţeleasă (în linii mari) după ce Hodgkin şi Huxley (1952 a) au arătat modul în care depinde conductanţa pentru sodiu a membranei de potenţialul transmembranar. La valoarea normală a potenţialului de repaus această conductanţă este foarte scăzută, dar ea creşte cînd se produce o depolarizare. Ca urmare, ionii Na^+ intră din exterior în axoplasmă accentuînd depolarizarea, deoarece fac ca interiorul fibrei să fie mai puţin negativ faţă de exterior. Accentuarea depolarizării măreşte în continuare conductanţa pentru sodiu, procesul tinzînd să continue pînă cînd interiorul fibrei ar deveni încărcat pozitiv la o valoare a potenţialului care să anuleze efectul gradientului de concentraţie, adică pînă la valoarea potenţialului de echilibru electrochimic al sodiului (în jur de +50 mV în interior faţă de exterior). În realitate, această valoare nu este atinsă, deoarece creşterea conductanţei pentru sodiu este un proces tranzitoriu scurt urmat de o creştere a conductanţei membranei pentru potasiu, ceea ce face ca acesta să iasă din axoplasmă în exterior compensînd din punct de vedere electric intrarea sodiului şi readucînd sistemul în condiţiile de repaus.

Hodgkin şi Huxley (1952 b) au elaborat o descriere detaliată a variaţiei conductanţelor ionice ale membranei în timpul excitaţiei, şi implicit a curenţilor ionici şi potenţialului de membrană, reprezentînd membrana axonului gigant prin circuitul echivalent din fig. III.14. Acest circuit se deosebeşte de cele prezentate anterior numai prin faptul că g_{Na} şi g_K (conductanţele membranei pentru sodiu şi potasiu)

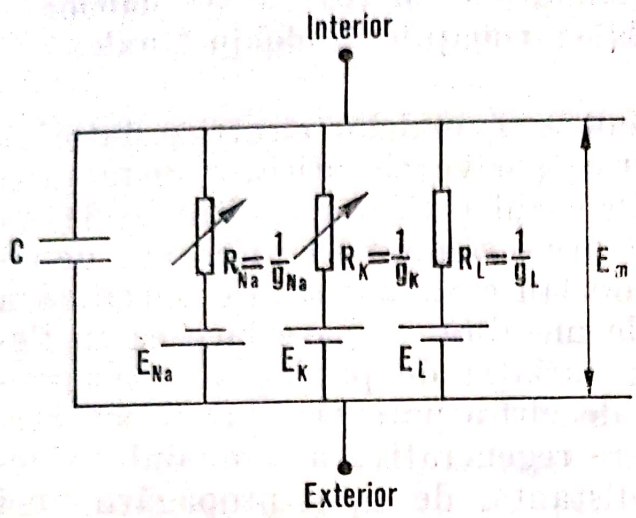


Fig. III.14. : Circuitul electric echivalent al membranei axonului gigant. E_m este potenţialul transmembranar, C — capacitatea membranei, cu R sînt notate rezistenţele parţiale, cu g conductanţele ionice parţiale ale membranei, iar cu E — potenţialele de echilibru electrochimic. Indicii Na, K şi L desemnează în mod respectiv ionii de sodiu, potasiu şi toţi ceilalţi ioni împreună („scurgerile"). Spre deosebire de conductanţele pentru sodiu şi potasiu, conductanţa de scurgeri a membranei nu variază în funcţie de E_m.

nu sînt constante, ci variază în funcţie de valoarea instantanee a potenţialului de membrană.

Măsurătorile lui K. S. Cole şi H. J. Curtis din 1938, referitoare la impedanţa axonului în timpul activităţii, au arătat că în timp ce rezistenţa electrică scade foarte mult, capacitatea membranei rămîne practic neschimbată (Cole, 1970). De aceea, în circuitul echivalent al membranei excitabile şi în ecuaţiile curentului prin membrană, capacitatea este considerată constantă. Unele studii recente au însă în vedere o variaţie a capacităţii membranei axonale în timpul activităţii, datorită deplasării intramembranare de sarcină electrică atunci cînd se deschid canalele ionice (Takashima, 1976).

Curentul membranic total I_m este format din componenta capacitivă $C\frac{dE_m}{dt}$ şi componenta datorată fluxurilor ionice prin membrană: $I_K + I_{Na} + I_L$, deci:

$$I_m = C\frac{dE_m}{dt} + I_K + I_{Na} + I_L. \qquad \text{(III.6.)}$$

Cu I_L este notat curentul transportat de toţi ionii în afară de K^+ şi Na^+; acest curent, fiind foarte mic şi constant în timp, este considerat o „scurgere" (indicele L este prescurtare de la *leakage*).

Relația de mai sus arată că, dacă într-un mod oarecare se obține $\frac{dE_m}{dt} = 0$, tot curentul membranic ține numai de fluxurile ionice. Această observație a determinat elaborarea tehnicii potențialului fixat (*clamp-voltage*) prin care pe o zonă extinsă a membranei axonale este menținut un potențial de membrană constant (III.1.1.).

Ținînd deci seama de faptul că propagarea excitației nervoase este asociată cu propagarea unor curenți electrici datorați în special ionilor K^+ și Na^+, caracterizarea fenomenologică a impulsului nervos revine la găsirea cineticii acestor fluxuri ionice. A. L. Hodgkin și A. F. Huxley au procedat în modul descris mai jos.

Se urmărește evoluția în timp a curentului membranic $I_m(t)$ în condiții de potențial fixat la o anumită valoare a E_m. Acest curent este compus din $I_K(t)$ și $I_{Na}(t)$. Cele două componente pot fi separate urmărind efectul produs de scăderea concentrației externe de sodiu, înlocuind NaCl cu clorură de colină, în soluția în care este plasat axonul gigant. Implicit, se presupune că fiecare flux ionic nu este influențat decît de gradientul electrochimic al ionului respectiv, ipoteză ce constituie „principiul independenței fluxurilor ionice".

În fig. III.15, este reprezentată descompunerea curentului ionic total I_i în cele două componente I_K și I_{Na}. Componenta de scurgeri I_L nu este reprezentată, ea intervenind ca un mic termen de corecție egal cu diferența care persistă între I_i și I_K la sfîrșitul unui puls de potențial fixat cu durata de cîteva milisecunde.

După ce se obțin curenții ionici I_K și I_{Na}, se trece la conductanțele membranei pentru respectivii ioni:

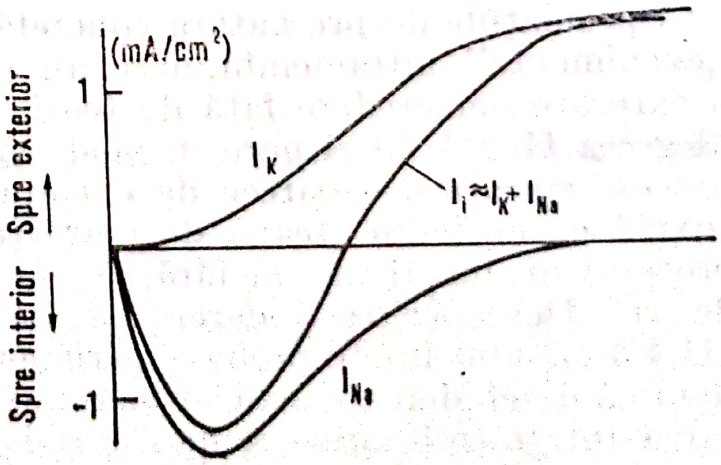


Fig. III.15.: Descompunerea curentului ionic total I_i în componentele vehiculate de sodiu (I_{Na}) și de potasiu (I_K).

$$g_K = I_K/(E_K - E_m); \; g_{Na} = I_{Na}/(E_{Na} - E_m),$$

definind conductanţa drept raportul dintre curentul ionic corespunzător şi gradientul de potenţial electric efectiv, adică diferenţa dintre potenţialul de echilibru electrochimic al ionului considerat şi potenţialul transmembranar.

Din analiza rezultatelor experimentale, Hodgkin şi Huxley au ajuns la concluzia că evoluţia în timp a conductanţei pentru sodiu a membranei poate fi exprimată sub forma:

$$g_{Na}(t) = g^{\circ}_{Na} \; m^3(t) \; h(t), \qquad \text{(III.7.)}$$

unde $m(t)$ şi $h(t)$ sînt nişte parametri adimensionali ce variază între 0 şi 1, iar g°_{Na} reprezintă conductanţa maximă pentru sodiu. Această expresie a conductanţei a fost *aleasă* astfel pentru a satisface cît mai bine datele experimentale care indică un proces rapid de activare şi unul mai lent de inactivare a conductanţei. Din punct de vedere formal, semnificaţia relaţiei de mai sus este că sodiul traversează membrana numai atunci cînd se produc simultan 3 evenimente cu probabilitatea de apariţie m şi 1 eveniment cu probabilitatea de apariţie h. Insistăm asupra faptului că dependenţa de tipul dat anterior nu provine pe cale deductivă dintr-un model referitor la procesele intramembranare care reglează conductanţa membranei pentru sodiu, ci a fost scrisă pentru că aşa se obţinea concordanţa optimă cu rezultatele experimentale. Odată scrisă, această dependenţă a fost interpretată ca exprimînd faptul că valoarea conductanţei pentru sodiu este proporţională cu numărul de locuri active (canale) din membrană care simultan sînt „ocupate" de trei particule care le activează şi nu sînt blocate de o particulă capabilă să le inactiveze.

Speculaţiile despre natura concretă a acestor particule şi „evenimente" intramembranare au determinat mult timp o oarecare neîncredere faţă de teoria Hodgkin-Huxley, dar alegerea făcută de ei pare în mod cert să corespundă unor procese specifice, deoarece de exemplu ionii de cesiu şi o toxină extrasă din steaua de mare (*Condylactis*) blochează procesul de inactivare h, fără să afecteze procesul descris de m. Descoperirea „curenţilor de poartă" (paragraful III.4.3.) a adus însă o probă experimentală fermă în sprijinul ideii că deschiderea canalelor sodiului este reglată de deplasarea intramembranară a unor particule încărcate electric.

Fiecare din probabilitățile m și h evoluează după un proces direct cu constanta cinetică α_m, respectiv α_h și unul invers cu constantele β_m, β_h, așa încît:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m \cdot m; \quad \frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h \cdot h. \quad \text{(III.8)}$$

Constantele cinetice α și β depind de temperatură (Guttman, 1966), de concentrația Ca^{2+} (Frankenhaeuser și Hodgkin, 1957) și de potențialul de membrană E_m. Lucrînd în condiții de potențial fixat la diferite valori ale E_m, din analiza datelor experimentale, s-au găsit următoarele dependențe:

$$\alpha_m = 0{,}1(E_m + 25) / \left[\exp\left(\frac{E_m + 25}{10}\right) - 1 \right]; \quad \beta_m = 4\exp(E_m/18)$$

$$\alpha_h = 0{,}7 \exp(E_m/20); \qquad \beta_h = 1 / \left[\exp\left(\frac{E_m + 30}{10}\right) + 1 \right].$$

Dependența de timp a conductanței pentru potasiu este exprimată de relația:

$$g_K(t) = g_K^{\circ} n^4(t), \quad \text{(III.9)}$$

ce poate fi interpretată în sensul că potasiul trece prin membrană atunci cînd au loc simultan 4 evenimente cu probabilitatea n. Variația în timp a acestui parametru este dată de ecuația cinetică:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n \cdot n,$$

iar constantele cinetice depind de potențialul de membrană conform cu relațiile:

$$\alpha_n = 0{,}01 \ (E_m + 10) / \left[\exp\left(\frac{E_m + 10}{10}\right) - 1 \right];$$

$$\beta_n = 0{,}125 \exp(E_m/80).$$

Conductanţa membranei pentru ionii care vehiculează curentul de scurgeri, g_L, este constantă.

Arătînd că variaţiile de potenţial se propagă de-a lungul membranei axonale cu viteza constantă $\theta = \frac{dx}{dt}$, atunci în mod evident:

$\frac{d}{dx} = \frac{1}{dx/dt} \cdot \frac{d}{dt} = \frac{1}{\theta} \cdot \frac{d}{dt}$, astfel încît din ecuaţia (III.3) putem scrie curentul membranic total sub forma:

$$I_m = \frac{1}{\theta^2(R_i + R_e)} \cdot \frac{d^2E_m}{dt^2}.$$

Înlocuind I_m pe baza relaţiei (III.6) şi ţinînd seama de (III.7) şi (III.9), se obţine ecuaţia diferenţială a variaţiei în timp a potenţialului de membrană, ecuaţie în care unica variabilă dependentă este E_m, variabila independentă fiind, evident, timpul:

$$\frac{1}{\theta^2(R_i+R_e)} \cdot \frac{d^2E_m}{dt^2} = C\,\frac{dE_m}{dt} + (E_K - E_m)g_K^\circ n^4 + (E_{Na} - E_m)\,g_{Na}^\circ m^3 h + (E_L - E_m)g_L. \qquad \text{(III.10)}$$

Rezolvarea numerică a acestei ecuaţii a dus la obţinerea variaţiei în timp a potenţialului de membrană în cursul excitaţiei. În fig. III.16, este reprodusă după Hodgkin (1964) soluţia calculată a unui impuls nervos propagat în axonul gigant şi variaţia conductanţelor parţiale ale membranei pentru sodiu şi potasiu.

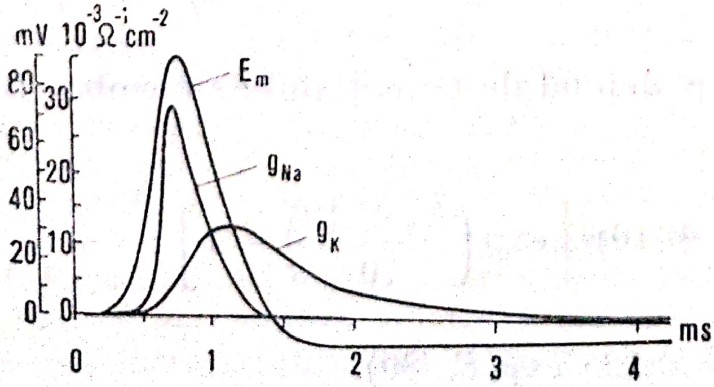


Fig. III.16.: Soluţia ecuaţiilor Hodgkin-Huxley: variaţia potenţialului de membrană şi a conductanţelor ionice pentru sodiu şi potasiu ale axonului gigant, obţinute prin integrarea ecuaţiilor empirice stabilite în special pe baza analizei curenţilor ionici în condiţii de potenţial fixat.

Este de remarcat faptul că soluţia calculată pentru un potenţial de acţiune propagat, soluţie care practic coincide cu potenţialele de acţiune înregistrate experimental, este obţinută prin integrarea numerică a ecuaţiilor (III.7—10), care au fost scrise numai pe baza datelor de potenţial fixat în care variaţia de potenţial nu se propagă. Aceasta atestă clar valoarea predictivă a teoriei lui Hodgkin şi Huxley.

Concordanţa deosebit de bună cu datele experimentale a rezultatelor la care duce integrarea ecuaţiilor empirice Hodgkin-Huxley a constituit cel mai important argument pentru succesul teoriei elaborate de ei. S-au ridicat şi numeroase obiecţii vizînd mai ales mecanismul sugerat de aceste ecuaţii (Tasaki, 1968; Wei, 1969) şi chiar validitatea principiului independenţei fluxurilor ionice (Segal, 1969).

În aprecierea teoriei Hodgkin-Huxley trebuie însă ţinut seama de faptul că aceasta are drept prim obiectiv înţelegerea şi descrierea cantitativă cît mai adecvată a fenomenologiei propagării impulsului nervos, fără să pornească de la vreo schemă detaliată de mecanism molecular asociat acestei fenomenologii. Sistemul de ecuaţii prezentat oferă unul dintre puţinele exemple în care un proces biologic (impulsul nervos) este descris în mod consistent în maniera cantitativă caracteristică fizicii.

Înţelegerea mecanismului proceselor fizico-chimice ce stau la baza impulsului nervos şi deci deducerea raţională a acestui sistem de ecuaţii aşa încît să nu mai fie empirice rămîne ca un obiectiv important al cercetărilor de biofizică.

Succesul ecuaţiilor Hodgkin-Huxley, elaborate pentru cazul particular al axonului gigant de calmar, a determinat adaptarea lor pentru a descrie propagarea excitaţiei şi în alte celule excitabile (Noble, 1966). Astfel, reuşind să analizeze în condiţii de potenţial fixat curenţii ionici dintr-un nod Ranvier al fibrei mielinizate de *Xenopus laevis* (broască africană), Frankenhaeuser şi Huxley (1964) au elaborat un sistem de ecuaţii empirice de acelaşi tip, cu deosebirea că în locul conductanţelor ionice parţiale ale membranei sînt utilizate permeabilităţile P_i definite prin ecuaţia Goldmann (§ II.2.2).

Curentul membranic total constă din componenta capacitivă $C(\mathrm{d}E_m/\mathrm{d}t)$ şi curenţii ionici: de sodiu (I_{Na}), de potasiu (I_K), de scurgeri (I_L) şi o componentă ionică nespecifică apărînd cu latenţă mare, notată I_p. Deci:

$$I_m = \frac{1}{\theta^2(R_i + R_e)} \cdot \frac{d^2E_m}{dt^2} = C\frac{dE_m}{dt} + I_{Na} + I_K + I_L + I_p.$$

Fiecare din curenţii ionici este, conform ecuaţiei Goldman, dat de o relaţie de tipul:

$$I_{Na} = P_{Na}\frac{E_m F^2}{RT} \cdot \frac{C^e_{Na} - C^i_{Na}\exp(E_m F/RT)}{1 - \exp(E_m F/RT)}.$$

Variaţia în timp a permeabilităţilor ionice ale membranei nodale în cursul unui potenţial de acţiune local este exprimată prin relaţiile: $P_{Na} = P^o_{Na}\, m^2 h$; $P_K = P^o_K\, n^2$; $P_L = P^o_L = \text{ct}$; $P_p = P^o_p\, p^2$, fiecare din parametrii adimensionali m, h, n, p fiind soluţia unei ecuaţii de tipul: $\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - \beta_m \cdot m$, în care constantele α şi β depind într-un mod cunoscut de temperatură, concentraţia Ca^{2+} şi potenţialul de membrană.

Integrarea acestui sistem de ecuaţii a permis reproducerea potenţialului de acţiune membranic dintr-un nod Ranvier, aproape identic cu cel înregistrat experimental. În fig. III.17., este reprezentată, după Frankenhaeuser şi Huxley (1964), soluţia calculată pentru potenţialul de acţiune local dintr-un nod şi variaţia curenţilor ionici în timpul acestui potenţial.

Încheiem acest paragraf accentuînd asupra faptului că fenomenologia impulsului nervos este descrisă cu mare acurateţe de teoria ionică, pe baza căreia au fost elaborate

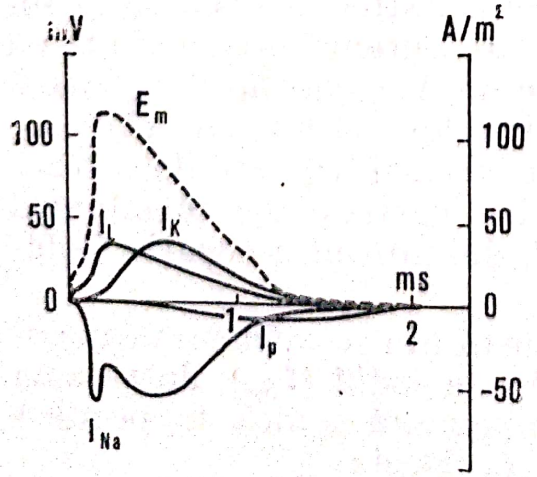


Fig. III.17.: Soluţia ecuaţiilor Frankenhaeuser-Huxley: variaţiile potenţialului de membrană şi ale curenţilor ionici în cursul excitaţiei într-un nod Ranvier.

sistemele de ecuaţii de tip Hodgkin-Huxley. Aceste ecuaţii sînt însă empirice, iar teoria oferă numai unele sugestii indirecte asupra mecanismelor de nivel molecular ale impulsului nervos şi ale fenomenelor ce pot avea loc în membrană în timpul excitaţiei.

III.4. CĂILE DE TRECERE A IONILOR PRIN MEMBRANA AXONALĂ ÎN TIMPUL EXCITAŢIEI

Descrierea potenţialului de acţiune în cadrul teoriei ionice ca rezultînd dintr-o creştere tranzitorie a permeabilităţii membranei axonale pentru sodiu şi apoi pentru potasiu implică în mod evident faptul că în timpul excitaţiei intră în axoplasmă sodiu din exterior (unde este mult mai concentrat) şi iese potasiu. Acest lucru a fost arătat în mod clar încă din jurul anului 1950 de către R. D. Keynes care, lucrînd cu izotopii radioactivi ^{42}K şi ^{24}Na, a măsurat fluxurile ionice care traversează membrana axonului gigant de calmar. El a găsit că pe durata totală a unui impuls (în jur de 2 ms) în axoplasmă intră o cantitate de $\approx 3 \times 10^{-12}$ mol Na^+ prin 1 cm^2 de suprafaţă membranară şi iese o cantitate aproximativ egală de potasiu.

Studiile făcute în condiţii de potenţial fixat au permis identificarea mai multor componente în fluxul total de ioni din timpul potenţialului de acţiune, fără totuşi să se poată spune dacă există căi diferite de traversare a membranei axonale de către fiecare tip de ioni şi nici dacă ionii pot trece prin toată suprafaţa membranei sau numai prin unele zone specializate. Faptul că nu există vreo relaţie simplă între dependenţa de timp a fluxului de Na^+ şi a celui de K^+ (aşa cum se vede din ecuaţiile diferite pentru g_{Na} şi g_K) sugerează însă existenţa unor căi diferite de trecere. În cele ce urmează, vom numi aceste căi de trecere „canale ionice" şi vom analiza cercetările recente care au dus la concluzia că ionii traversează membrana numai prin anumite structuri specializate, că sodiul şi potasiul trec prin canale ionice diferite şi care au permis măsurarea numărului şi a rezistenţei electrice a acestor canale ionice, deci implicit estimarea numărului de ioni care trec printr-un canal (Hille, 1970).

III.4.1. Farmacologia canalelor ionice și distribuția lor în membrana axonală

Cercetările lui Narahashi și colab. (1964; 1967), Nakamura și colab. (1965) și Hille (1966) au arătat că aplicarea de tetrodotoxină (TTX)* sau de saxitoxină (STX)* în soluția care scaldă un axon gigant sau o fibră mielinizată determină abolirea curentului de sodiu I_{Na}, fără să afecteze ceilalți curenți (I_K și I_L) (fig. III.18).

În rezumat, observațiile experimentale sînt următoarele:

— În concentrații de 0,1 μM în soluția externă, TTX și STX abolesc complet I_{Na}, atît în axonii giganți, cît și în fibrele mielinizate, în timp ce I_K și I_L nu sînt afectați nici de concentrații de 100 × mai mari.

— Atunci cînd Na^+ este înlocuit cu substituenții săi posibili (Li^+, NH_4^+), și curenții acestora sînt aboliți în același fel, ceea ce arată că efectul nu este datorat unei interacțiuni specifice a toxinelor cu ionii Na^+, ci unei blocări selective a canalelor prin care trece sodiul.

— Aplicarea de TTX și STX în interiorul axonilor giganți perfuzați nu inhibă curentul de sodiu, chiar cînd se folosesc concentrații de 1 μM, ceea ce arată că „receptorul" sensibil la aceste substanțe este localizat pe fața externă a membranei

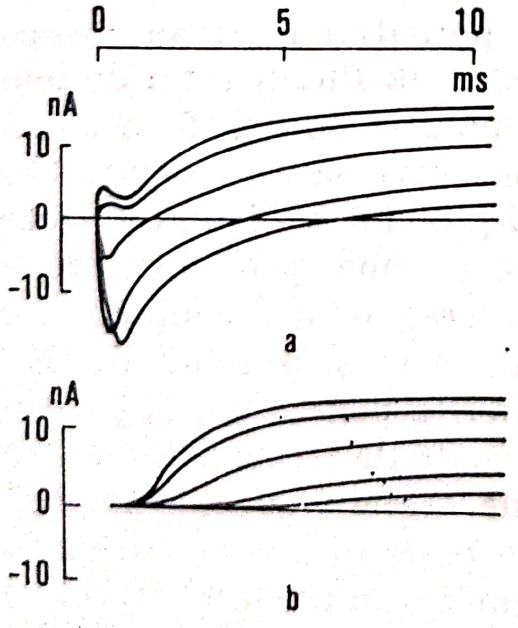


Fig. III.18. (după Hille, 1970): Efectul TTX asupra curenților ionici prin membrana nodului Ranvier de la fibra de broască, măsurați în condiții de potențial fixat cu pulsuri de diferite valori a) soluție Ringer; b) soluție Ringer cu 300 nM TTX.

* TTX și STX sînt două toxine hidrosolubile, ce se găsesc în majoritatea țesuturilor peștelui japonez *Spheroides rubrides* și, respectiv, în dinoflagelatele *Gonyaulax catanella* (Kao, 1966).

axonale. În ansamblu, rezultă deci că sistemul molecular ce determină închiderea canalelor sodiului este localizat în exteriorul membranei axonale.

Pe baza ecuațiilor Hodgkin-Huxley, inhibarea I_{Na} poate fi atribuită următorilor factori: a) scăderea numărului de canale capabile să devină permeabile (Δg^0_{Na}); b) accentuarea inactivării conductanței membranei pentru sodiu [$\Delta(1-h)$]; c) scăderea conductanței pentru sodiu (Δm). Experiențele efectuate în condiții de potențial fixat (Takata și colab., 1966) au arătat că TTX nu afectează parametrii m și h, singurul efect fiind reducerea g^0_{Na}, deci blocarea canalelor sodiului.

Studierea cineticii interacției dintre toxine și membranele axonale (Cuervo și Adelman, 1970; Hille, 1968) a dus la concluzia că singurii „receptori" membranari cu care interacționează toxinele sînt unele formațiuni moleculare specifice canalelor sodiului. Legarea de acestea se face în raport de 1 : 1, așa încît, dacă fiecare canal pentru Na este asociat cu un singur receptor, rezultă că se poate obține o estimare a numărului de canale, pe baza cantității de toxină legată de membrană.

Deoarece TTX și STX acționează asupra nervului în concentrații nanomolare, atunci cînd un nerv este plasat într-un volum foarte mic ($\approx$ 50 μl) de soluție de toxină, avînd exact concentrația care inhibă complet I_{Na} (și deci conducerea impulsurilor), cantitatea de toxină care se fixează pe nerv reprezintă o fracțiune considerabilă din totalul inițial de toxină din soluție. Administrînd această soluție unui alt nerv și măsurînd gradul de inhibare a I_{Na} în acest nerv, pe baza relației (Doză toxină) — (Efect inhibitor), se poate deduce cantitatea de toxină rămasă în soluție și aceea fixată de primul nerv. În felul acesta, s-a ajuns la concluzia că în membranele axonale ale fibrelor nemielinizate din nervul vag de iepure și în membranele axonilor giganți de crab și de homar sînt 75, 49 și respectiv 36 canale ionice pe 1 μm^2 (Keynes și colab., 1971). Este posibil ca aceste valori să fie afectate de erori experimentale considerabile, însă, reținînd chiar numai ordinul de mărime, rezultă cîteva concluzii interesante. Astfel, canalele ionice din nervul vag de iepure sînt distanțate în medie la 0,1 μm. Ținînd seama de faptul că diametrul mediu al acestor fibre este 0,76 μm, rezultă că zonele prin care intră Na^+ în interiorul fibrei în timpul PA sînt foarte rare: un canal corespunde la $\approx$ 30 000

molecule fosfolipidice din membrană, unei molecule corespunzîndu-i pe membrană o suprafaţă de 0,5 nm^2. Canalele prin care ionii de sodiu sînt pompaţi prin transport activ afară din fibră sînt de 10 × mai dese : 750/μm^2 în nervul vag de iepure (Landowne şi Ritchie, 1970).

Estimări analoage pentru axonii giganţi de calmar şi homar şi pentru fibrele mielinizate de broască au dus la concluzia că în membranele acestora, canalele pentru sodiu sînt distanţate, la 0,6 ; 0,3 şi respectiv, 0,06 μm.

Conductanţa unui singur canal pentru sodiu rezultă a fi $0{,}15 \cdot 10^{-9}\ \Omega^{-1}$, deoarece conductanţa maximă pentru sodiu a membranei axonilor de homar este 5300 $\Omega^{-1}m^{-2}$ (Narahashi şi colab., 1964) şi sînt 36 canale/μm^2.

Cunoscînd conductanţa unui canal, numărul de canale şi fluxul de sodiu prin membrană, rezultă imediat numărul de ioni ce trec printr-un canal în unitatea de timp. S-a calculat astfel că, printr-un singur canal pentru sodiu din membrana axonului gigant de calmar trec $\approx 4 \cdot 10^8$ ioni Na/s, în timpul PA.

Obţinerea tuturor datelor referitoare la canalele de trecere a sodiului prin membrana axonală a fost posibilă numai după identificarea unor inhibitori specifici ai acestor canale (TTX şi STX). În mod analog cu aceste substanţe, altele inhibă în mod selectiv canalele de trecere a potasiului, fără să afecteze celelalte componente ale fluxurilor ionice, în afară de I_K. Astfel, sînt ionii cuaternari de amoniu şi, în special, ionul tetraetilamoniu (TEA). Se cunoaşte de mult timp faptul că TEA prelungeşte durata potenţialului de acţiune, determină descărcări repetitive şi se opune acţiunii depolarizante a ionilor K^+.

Cercetări mai noi au arătat clar că TEA determină inhibarea curentului de potasiu (I_K), fără să afecteze ceilalţi curenţi. În cazul fibrelor mielinizate de broască, prezenţa în soluţie a 6 mM TEA reduce I_K cu 90 %, lăsînd neschimbaţi I_K şi I_K (Hille, 1967) (fig. III. 19).

Curba (Doză) — (Efect inhibitor) sugerează că reacţia dintre TEA şi receptorul său specific este în raport de 1 : 1. Administrarea simultană de TTX nu schimbă cu nimic efectul TEA, după cum nici efectul TTX nu este influenţat de către TEA, acest fapt constituind o probă evidentă a independenţei funcţionale a canalelor pentru Na şi K. Axonul gigant este insensibil la 100 mM TEA în soluţia externă, dar o concentraţie de numai 40 mM în soluţia de perfuzie

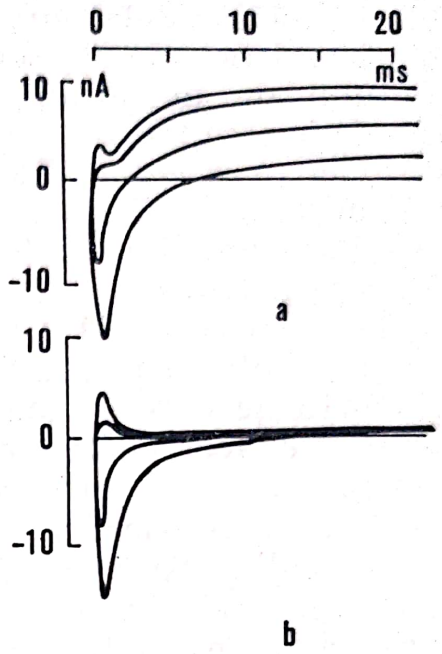


Fig. III.19. (după Hille, 1970): Efectul TEA asupra curenților ionici prin membrana nodului Ranvier. a) soluție Ringer; b) soluție Ringer cu 6 mM TEA.

internă determină o modificare imediată și specifică a I_K, (Armstrong și Binstock, 1965), ceea ce arată că receptorul sensibil la TEA este localizat pe fața internă a membranei axonale.

Armstrong (1975) a estimat că în axonul gigant de calmar sînt în jur de 10^3 canale/μm^2 pentru K^+, conductanța unui canal fiind de $2-3 \times 10^{-12}\ \Omega^{-1}$, iar viteza de trecere a ionilor de aproximativ $2-3 \times 10^6$ ioni K^+/s prin fiecare canal.

La rezultate similare s-a ajuns și pe o cale complet diferită, anume prin studierea „zgomotului electric de membrană", adică a fluctuațiilor spontane ale potențialului de membrană (sau ale curentului transmembranar) în jurul valorii la care este fixat. Aceste fluctuații provin din caracterul aleatoriu al fenomenelor microscopice de traversare a membranei axonale de către ionii care vehiculează curentul electric. Încă din 1965, A. Verveen și H. Derksen au observat fluctuații aleatorii ale potențialului de repaus în nodul Ranvier al axonilor de broască. Hiperpolarizarea sau depolarizarea prin intermediul unui curent constant din exterior, ca și modificările concentrației potasiului în soluția externă produc modificări ale intensității acestor fluctuații, sugerînd legătura lor directă cu trecerea prin membrană a ionilor de potasiu.

O dovadă și mai clară a faptului că zgomotul de membrană exprimă fluctuațiile microscopice ale trecerii potasiului este aceea că zgomotul este modificat puternic de TEA (care

blochează canalele potasiului), dar nu și de TTX (care le blochează pe cele ale sodiului). Prelucrarea statistică a zgomotului de membrană a permis estimarea numărului de canale pentru potasiu ca fiind între 500 și 1000/μm^2 în nodul Ranvier (Verveen și DeFelice, 1974). Rezultate similare au fost obținute și din studiul zgomotului electric în membrana axonilor nemielinizați de homar (Poussart, 1971) și de calmar (Fishman, 1973).

Încheind această prezentare a distribuției canalelor de sodiu și potasiu în membranele axonale, merită să amintim și eforturile care se fac pentru a extrage din membranele neuronale acei componenți care alcătuiesc canalele ionice pentru a-i putea caracteriza din punctul de vedere al compoziției și, ulterior, al structurii.

Goodall și Sachs (1972) au arătat că în extrase de creier și de organe electrice ale peștilor sînt substanțe a căror adăugare pe filme lipidice determină apariția a două tipuri de canale, ambele specifice pentru potasiu, dar avînd conductanțe și durate de viață foarte diferite. Modificînd procedeul de extracție, ei au putut obține și canale selective pentru sodiu. Ținînd seama de stabilitatea termică și de caracteristicile de solubilitate, acești autori sugerează că substanțele care formează canalele sînt peptide sau lipopeptide cu greutate moleculară scăzută.

III.4.2. Structura canalelor ionice

După stabilirea certă a faptului că ionii Na^+ și K^+ traversează membrana axonală prin canale diferite, se ridică în mod firesc problema modului în care respectivele canale pot distinge între doi ioni atît de apropiați din punctul de vedere al proprietăților fizico-chimice, așa cum sînt aceștia. Datorită în special cercetărilor lui B. Hille de după 1970, această problemă de maximă importanță pentru înțelegerea bazelor biofizice ale funcționării membranelor excitabile a fost în mare parte elucidată (Hille, 1971 ; 1972 ; 1973 ; 1975), prin obținerea unei imagini destul de bine conturată a profilului funcțional al canalelor.

Permeabilitatea canalelor sodiului este foarte mare pentru cationii hidroxilamină și hidrazină care au aceleași dimensiuni van der Waals ca și ionul de sodiu cu o moleculă de apă ($H_2O \cdot Na^+$), dar sînt aproape complet impermeabile pentru cationii metilamină care au și ei aceleași dimensiuni.

Interpretarea dată de B. Hille acestui fapt este că ionii de sodiu trec prin canale sub forma complexului $H_2O \cdot Na$ și că aceste canale conțin un „filtru de selectivitate" constînd din grupări cu oxigen ionizat cu care complexul formează legături de hidrogen înainte să treacă. Hidroxilamina și hidrazina pot și ele forma legături de hidrogen, dar metilamina nu. În ceea ce privește dimensiunile, ionul K^+ ar putea trece prin canalele sodiului atunci cînd nu este hidratat, dar în acest caz nu poate forma legături de hidrogen, iar atunci cînd este hidratat este prea mare. Filtrul de selectivitate al canalului de sodiu se prezintă în secțiune transversală ca un por cu dimensiunile de 3,1 Å/5,1 Å limitat de 6 atomi de oxigen.

Pentru canalele potasiului, Hille (1973) și Bezanilla și Armstrong (1972) au propus imaginea de pori cvasicilindrici cu diametrul de 3—3,3 Å. Acest diametru mic explică de ce cationi organici ca hidrazina și guanina, ce pot trece prin canalele sodiului, sînt practic impermeabili prin aceste canale. Faptul că sodiul și litiul nu pot trece este explicat prin aceea că intensitatea cîmpului electrostatic în canal este mică, așa încît acești ioni nu pierd apa de hidratare care este legată mai puternic decît cea a potasiului. Nepierzînd apa de hidratare, ei nu pot intra în canal.

III.4.3. Curenții „de poartă"

Atunci cînd au analizat dependența conductanțelor membranei pentru sodiu și potasiu (g_{Na} și g_K) de potențialul de membrană, Hodgkin și Huxley (1952) au interpretat variațiile de permeabilitate drept rezultatul reorientării sub influența cîmpului electric a unor molecule din membrană care au sarcină electrică sau moment dipolar. Referitor la g_{Na}, ei au afirmat că aceasta este determinată de niște molecule încărcate negativ care, în funcție de valoarea potențialului transmembranar (E_m), sînt repartizate într-o distribuție Boltzmann între exteriorul și interiorul membranei, conductanța fiind proporțională cu numărul de astfel de molecule aflate în interior. Pentru a explica variația rapidă a g_{Na} în funcție de E_m, ei au admis că fiecare loc de trecere a sodiului (canal) este controlat de 6 molecule cu cîte o sarcină electronică sau de o moleculă cu 6 sarcini electronice sau de o moleculă dipolară cu 3 sarcini negative la un capăt și 3

pozitive la celălalt. Pe baza acestei analize, Hodgkin şi Huxley au afirmat că trebuie să existe un curent îndreptat de la interiorul spre exteriorul membranei care precede I_{Na}, dar care este complet mascat de acesta, deoarece prin fiecare canal trece un număr de ioni mult mai mare decît cele 6 sarcini care controlează deschiderea sa.

Concluzia existenţei unei redistribuiri intramembranare de sarcini electrice care controlează deschiderea canalelor pentru sodiu, concluzie la care Hodgkin şi Huxley au ajuns numai prin analiza teoretică aprofundată a rezultatelor obţinute cu posibilităţile tehnice de atunci, ilustrează în modul cel mai grăitor valoarea predictivă a teoriei, căci abia după mai mult de două decenii au putut fi măsuraţi curenţii daţi de această redistribuire de sarcini, numiţi curenţi „de poartă" (Armstrong şi Bezanilla, 1973).

Pentru a putea evidenţia curenţii de poartă ce preced curentul de sodiu prin membrana axonului gigant, exprimînd deschiderea canalelor sodiului prin deplasarea spre interior a unor sarcini electrice negative, Armstrong şi Bezanilla (1973; 1974), apoi Keynes şi Rojas (1974) au blocat atît curentul de sodiu I_{Na} — punînd în exterior o soluţie fără sodiu şi adăugînd TTX — cît şi curentul de potasiu — — perfuzînd axonul cu soluţie de CsF. Este necesară, de asemenea, înlăturarea componentei simetrice a curentului capacitiv, componentă care exprimă redistribuirile de electroni pe moleculele apolare (lipidice) din membrană şi deplasările de ioni care vehiculează curentul capacitiv de la suprafaţa membranei de electrozi (fig. III.20). În timp ce aceste procese decurg în mod simetric atît pentru un puls de depolarizare, cît şi de hiperpolarizare, deschiderea canale-

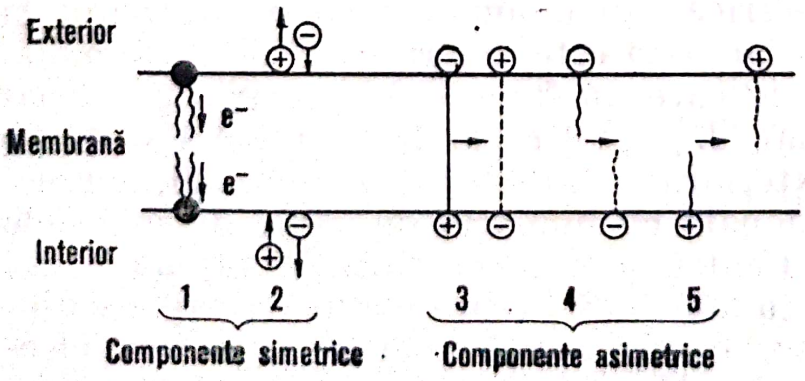


Fig. III.20. : Diferitele componente posibile ale curentului capacitiv prin membrana axonală, în urma aplicării unui puls de depolarizare.

lor se produce numai pentru pulsuri de depolarizare, curenţii de poartă fiind deci asimetrici. Pentru a înlătura componenta simetrică, s-au aplicat cîte 10—100 pulsuri de depolarizare şi un număr egal de pulsuri de hiperpolarizare şi s-au adunat curenţii care apar. Componenta asimetrică obţinută prin acest proces de mediere constă la începutul pulsului de depolarizare dintr-un curent îndreptat spre exterior care creşte rapid scăzînd apoi exponenţial, iar la sfîrşitul pulsului, dintr-un curent similar îndreptat spre interior (fig. III.21).

Variaţia în timp a curenţilor de poartă constatată experimental (fig. III.21) poate fi descrisă pornind de la ipoteza menţionată anterior că există un sistem de N particule încărcate, identice şi care pot suferi în mod independent o tranziţie de ordinul întîi între interiorul şi exteriorul membranei.

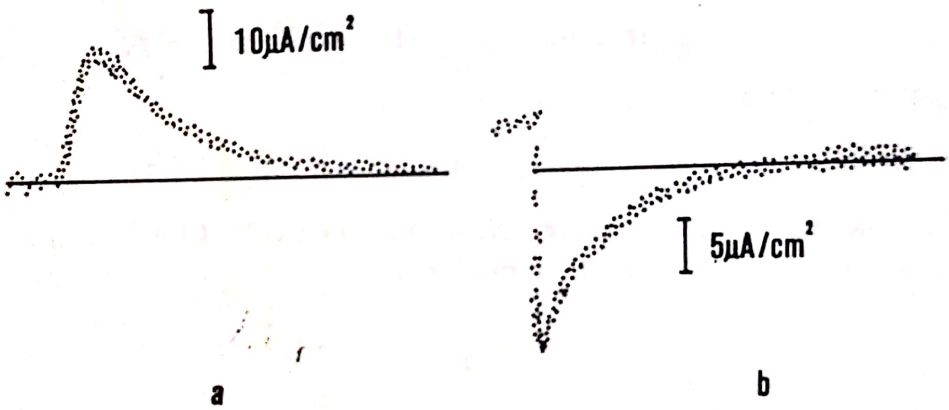


Fig. III.21. (după Armstrong şi Bezanilla, 1974): Curenţii de poartă la aplicarea (*a*) şi imediat după (*b*) pulsuri cu amplitudinea de 70 mV. Înregistrările sînt obţinute prin medierea pe 50 de pulsuri pozitive şi 50 negative, în condiţiile blocării curenţilor ionici.

Dacă la o valoare oarecare V a potenţialului transmembranar N_1 particule sînt în interior şi $N_2 = N - N_1$ în exterior, raportul acestor numere va fi dat de distribuţia Boltzmann*:

$$\frac{N_1}{N_2} = \exp[-z'e(V - V')/kT],$$

* Distribuţia Boltzmann dă numărul de particule dintr-o populaţie omogenă care se situează pe un anumit nivel energetic dintr-un ansamblu de nivele posibile. Pentru detalii, pot fi consultate manualele de fizică statistică, de exemplu: LANDAU L., LIFCHITZ E., *Physique statistique*, Mir, Moscova, 1967.

în care: z' este valența efectivă a fiecărei particule; e — sarcina electrică elementară; k — constanta lui Boltzmann; T — temperatura absolută, iar V' — valoarea potențialului la care particulele sînt distribuite uniform ($N_1 = N_2$). Fracțiunea din numărul total de particule aflate în interior este:

$$p = N_1/(N_1 + N_2) = \exp\ [-z'e(V - V')/kT]/\{1 + \exp[-z'e(V - V')/kT]\}.$$

În ipoteza unei tranziții de ordinul întîi, p variază conform cu ecuația:

$$\frac{dp}{dt} = \alpha(1 - p) - \beta p,$$

în care α este probabilitatea de tranziție a particulelor din exterior spre interior (deci de deschidere a canalelor), iar β este probabilitatea de tranziție în sens invers. Notînd: $\tau = 1/(\alpha + \beta)$;

$$p(t = 0) = p_0 \quad \text{și} \quad p(t \to \infty) = p_V,$$

soluția acestei ecuații este:

$$p = p_V + (p_0 - p_V)\ \exp\ (-t/\tau).$$

Sarcina totală a celor $(N_1 + N_2)$ particule fiind: $Q_{tot} = z'e(N_1 + N_2)$ curentul de poartă va fi în mod evident:

$$I = Q_{tot}\frac{dp}{dt}.$$

Pe baza ultimei ecuații pentru p, acest curent va varia în timp după formula:

$$I = Q_{tot}\frac{(p_V - p_0)\exp(-t/\tau)}{\tau},$$

atunci cînd potențialul de membrană este trecut de la valoarea de repaus pentru $p = p_0$ la valoarea V. S-a obținut astfel o relație care explică variația de tip exponențial a curenților de poartă. Constanta de timp τ poate fi și ea exprimată în funcție de V, V' și T, însă făcînd ipoteze suplimentare asupra tipului de barieră energetică ce separă cele două poziții ale particulelor încărcate.

Componenta asimetrică a curentului capacitiv, înregistrată experimental în modul descris anterior, este, în mod cert, dată de deplasarea unor particule încărcate ce fac parte integrantă din membrană, deoarece transferul total de sarcină la începutul pulsului este egal și de sens contrar cu cel de la sfîrșitul acestuia, iar temperatura modifică puternic

evoluţia în timp a acestui curent de deplasare, dar nu afectează valoarea transferului total de sarcină. În cazul axonului gigant de calmar, sarcina electrică totală a particulelor care suferă tranziţia de pe o faţă pe alta a membranei a fost estimată la aproximativ 1900 sarcini elementare/μm^2 (Keynes şi Rojas, 1974). Faptul că în mod efectiv aceste particule sînt cele care controlează conductanţa pentru sodiu a membranei este confirmat de următoarele argumente: a) constanta de timp a curenţilor de poartă este aceeaşi ca pentru variabila m din sistemul de ecuaţii Hodgkin-Huxley, variabilă care descrie activarea curentului de sodiu şi b) compararea curbelor care dau distribuţia staţionară a particulelor încărcate cu cele care dau conductanţa pentru sodiu sugerează că aceste particule operează în grupuri de cîte 3, adică aşa cum au reprezentat Hodgkin şi Huxley conductanţa g_{Na} ca funcţie de m^3.

Un studiu asemănător în principiu cu cele prin care au fost puşi în evidenţă curenţii de poartă prin membrana axonului gigant a fost făcut de Nonner, Rojas şi Stämpfli (1975) pe nodul Ranvier al fibrelor mielinizate de broască, obţinînd concluzii de genul celor prezentate anterior. Menţionăm, în sfîrşit, observaţia că procaina — substanţă întrebuinţată ca anestezic local — reduce puternic curenţii de poartă, deci scade amplitudinea deplasării intermembranare a particulelor încărcate electric (Keynes şi Rojas, 1974), observaţie ce deschide o nouă perspectivă privind mecanismul molecular de acţiune a anestezicelor asupra membranei excitabile.

***

În concluzie, referitor la căile de trecere a ionilor prin membrana axonală în timpul excitaţiei, putem reţine ca certe următoarele aspecte: în axolemă există pori apoşi, permeabili în mod selectiv pentru sodiu şi potasiu; ambele tipuri de pori sînt rari, distanţele dintre ei pe membrană fiind de ordinul cîtorva mii de molecule lipidice; canalele sodiului sînt blocate selectiv de tetrodotoxină iar cele ale potasiului de ionii de tetraetilamoniu. Permeabilitatea selectivă a fiecărui tip de canale pentru ionii corespunzători se explică prin filtre atît structurale, cît şi energetice: moleculele mari sînt împiedicate să intre în pori din motive structurale, în timp ce intensitatea cîmpului electrostatic permite discriminarea între ionii mici. Conductanţa canalelor este

activată (deschiderea canalelor) prin deplasarea intramembranară a unor molecule (sau grupări) încărcate electric plasate în poziții-cheie în cadrul canalului; această deplasare intramembranară de sarcină constituie curenții „de poartă".

III.5. MODIFICĂRILE OPTICE ASOCIATE CU PROPAGAREA IMPULSULUI NERVOS

O problemă a cărei rezolvare condiționează elucidarea mecanismului biofizic al excitației este acela al eventualelor schimbări în structura membranei excitabile, asociate cu propagarea impulsului. Ținînd seama de faptul că potențialul de acțiune are la bază creșteri tranzitorii ale conductanței membranei axonale, este de presupus că aceste creșteri reflectă producerea în membrană a anumitor modificări structurale. În principiu, astfel de schimbări structurale pot fi puse în evidență urmărind interacția diferitelor radiații electromagnetice cu membrana excitabilă. Pentru ca radiațiile utilizate să nu producă în membrana excitabilă (deci „vie") denaturări care să-i compromită funcția, trebuie să se lucreze în domeniul vizibil.

Încă din 1949, D. K. Hill și K. D. Keynes au observat o scădere lentă a intensității luminii difuzate de un nerv de crab în timpul și după conducerea unui număr mare (aproximativ 500) de impulsuri și au emis ipoteza că scade indicele de refracție al fibrelor nervoase în urma unei mici creșteri de volum. Această creștere de volum în urma stimulării poate fi atribuită intrării apei în fibra nervoasă pentru echilibrarea osmotică a surplusului de ioni de sodiu acumulați în fibră în urma conducerii impulsurilor. Studierea modificărilor optice din timpul propagării unui singur impuls nervos a putut fi abordată numai după realizarea unor sisteme capabile să detecteze variații foarte mici ale unui flux luminos ($\approx 10^{-6}$ din valoarea de bază), elementul esențial în acest sens fiind un calculator de mediere a unui număr mare de înregistrări succesive, mediere în urma căreia este îmbunătățit considerabil raportul semnal/zgomot.

III.5.1. Modificări de birefringență

Un nerv de crab sau un axon de calmar plasat cu axa lungă perpendicular pe direcția de propagare a luminii, între

polarizori încrucişaţi, apare strălucitor atunci cînd este la 45° faţă de planul de polarizare al luminii incidente pe el (fig. III.22). Birefringenţa* de repaus a axonilor giganţi este de $6{,}6 \cdot 10^{-5}$, corespunzînd unei diferenţe de drum optic între raza ordinară şi cea extraordinară de 56 nm. În cazul nervilor de crab, această întîrziere este de 32 nm. La trecerea unui impuls printr-un nerv de crab, birefringenţa sa variază exact paralel cu potenţialul de acţiune, însă în sens invers, maximul potenţialului de acţiune corespunzînd cu o scădere a birefringenţei de $\approx 5 \cdot 10^{-4}$ din valoarea de repaus (Cohen şi colab., 1968 ; Berestovsky şi colab., 1969). În axonul gigant de calmar, birefringenţa variază similar, însă şi mai puţin : $\approx 8 \cdot 10^{-6}$ din valoarea de repaus (Cohen şi colab., 1970). Este clar că pentru a sesiza variaţii atît de mici, care după amplificări succesive apar înnecate în zgomot, se impune medierea unui număr mare (≈ 1000) de înregistrări.

Lucrîndu-se pe axoni giganţi goliţi de axoplasmă şi perfuzaţi cu o soluţie salină, s-a găsit aceeaşi variaţie a birefringenţei ca şi în cazul axonilor intacţi (fig. III.23), ceea ce arată că acest fenomen nu este asociat cu axoplasma, ci numai cu membrana excitabilă. Experienţele făcute în con-

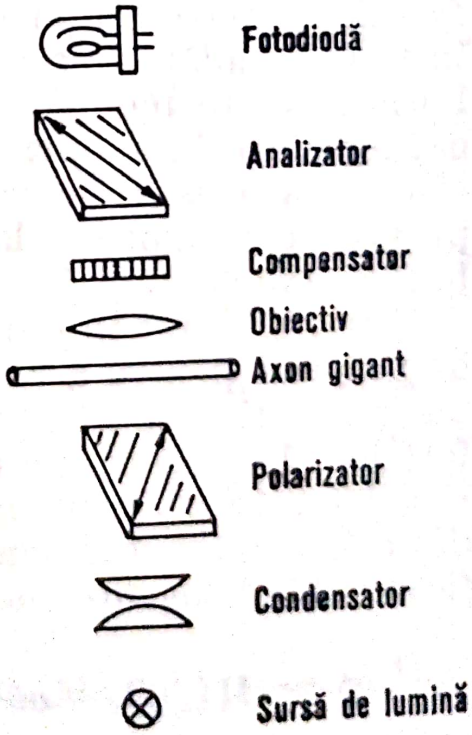


Fig. III.22. (după Cohen şi colab., 1970) : Diagrama sistemului de măsură a birefringenţei axonului gigant.

* Birefringenţa este proprietatea unor materiale (în primul rînd cristale) de a da pentru o singură rază incidentă două raze refractate polarizate în planuri perpendiculare. Materialele birefringente prezintă deci doi indici de refracţie.

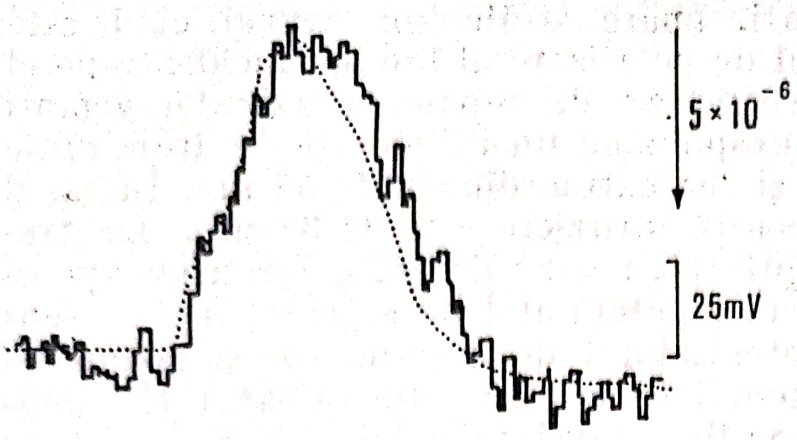


Fig. III.23. (după Cohen şi colab., 1970) : Variaţia birefringenţei (linia groasă) unui axon gigant perfuzat intern, în timpul unui potenţial de acţiune (linia subţire).

diţii de potenţial fixat au evidenţiat cu claritate faptul că variaţia birefringenţei are aproximativ aceeaşi formă ca şi potenţialul de membrană, în timp ce curenţii ionici şi conductanţele variază altfel, aşa încît se consideră că cel puţin 90% din acest efect este direct dependent de potenţial (Cohen şi Landowne, 1970).

Substanţe ca procaina şi butanolul, care afectează puternic membranele lipidice, nu au nici un efect asupra modificărilor birefringenţei din timpul potenţialului de acţiune, în timp ce adăugarea de TTX şi STX în mediul extern anihilează aceste modificări optice. Ţinînd seama şi de faptul că, injectate în axoplasmă, TTX şi STX nu produc nici un efect, s-a tras concluzia că modificările de birefringenţă provin de la moleculele proteice din zona externă a membranei axonale.

Efectul Kerr* în proteinele membranare poate fi suficient de puternic pentru a explica fenomenul observat, dar acesta mai poate fi atribuit şi reducerii grosimii membranei datorită forţelor electrostrictive (Cohen şi colab., 1968; Berestovsky şi colab., 1970). Pînă în prezent, nu se poate preciza care din cele două mecanisme, sau dacă ambele, determină modificarea birefringenţei nervului în timpul activităţii.

III.5.2. Modificări ale difuziei luminii

Difuzia luminii de către nerv a fost studiată iluminînd o zonă de 1—3 mm cu un spot concentrat de lumină albă şi

* Efectul Kerr este birefringenţa artificială produsă de cîmpul electric asupra unor substanţe care în mod normal nu au această proprietate.

culegînd lumina difuzată sub diferite unghiuri la o distanță de 1 cm de nerv. După amplificare, semnalul de la fototubul de culegere a luminii difuzate este trecut printr-un calculator de mediere. Atunci cînd nervul este stimulat, intensitatea luminii difuzate de el variază aproximativ paralel cu potențialul de membrană, însă aceste variații diferă foarte mult în funcție de unghiul de difuzie (Cohen și Keynes, 1971; Cohen și colab., 1968). Astfel, pentru unghiuri între 10 și 45°, în timpul potențialului de acțiune scade intensitatea luminii difuzate cu aproximativ $10^{-6}-10^{-5}$ din nivelul de repaus, iar pentru unghiuri între 70 și 120° intensitatea luminii difuzate crește cu aproximativ aceeași valoare. Deși variațiile intensității luminii difuzate de nerv în timpul conducerii impulsului nervos sînt atît de mici, s-a stabilit în mod cert că nu sînt artefacte deoarece nu se produc niciodată atunci cînd conducerea în nerv este blocată (prin exces de K, lipsă de Na sau prin tratarea cu TTX).

Pentru a se stabili cu ce proces anume din timpul potențialului de acțiune sînt asociate variațiile intensității luminii difuzate, s-a lucrat în condiții de potențial fixat pe axoni giganți perfuzați intern (Cohen și Keynes, 1969; Cohen și Landowne, 1970). Așa cum se observă din fig. III.24, în timpul unui puls de hiperpolarizare apare o creștere abia vizibilă, în timp ce pentru un puls de depolarizare este o scădere pronunțată a intensității luminii difuzate de axon. Avînd aceeași formă ca și potențialul de membrană, variațiile intensității luminii difuzate în timpul hiperpolarizării depind de potențial, în timp ce în cazul depolarizării difuzia luminii nu urmează nici variațiile de potențial, nici de conductanțe, ci sînt proporționale cu integrala curentului ionic ce traversează membrana (Cohen și Landowne, 1970; Keynes, 1970). Variațiile luminii difuzate sub unghiuri mici de un axon gigant diferă de cele pentru unghiuri mari, însă în ambele cazuri se poate distinge o componentă dependentă

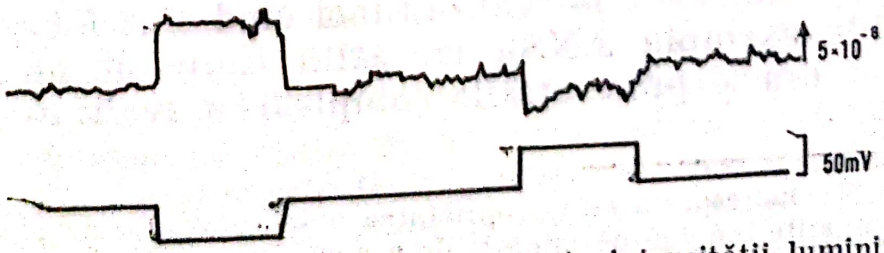


Fig. III.24. (după Cohen și Landowne, 1970): Variația intensității luminii difuzate de un axon gigant în condiții de potențial fixat.

de potenţial şi una dependentă de integrala curentului.

Mecanismele posibile ale variaţiilor dependente de potenţial ale intensităţii luminii difuzate sînt aceleaşi ca în cazul modificărilor de birefringenţă discutate anterior. Faptul că modificările intensităţii luminii difuzate dependente de curenţii ionici sînt proporţionale cu integrala curentului arată că acestea sînt determinate de cantitatea de sarcină ce traversează membrana şi nu de intensitatea acestei traversări. Sensul acestor modificări de difuzie a luminii se inversează atunci cînd sensul curentului este inversat, dar, raportate la cantitatea de sarcină, modificările sînt aceleaşi indiferent de sensul curentului, ceea ce face improbabil ca ele să fie datorate unor efecte specifice ale sodiului sau ale potasiului. Ca o explicaţie posibilă a variaţiilor dependente de curenţi ale intensităţii luminii difuzate de către axon în timpul conducerii influxului nervos, a fost presupusă efectuarea de către fluxul de curent a unor modificări conformaţionale ale macromoleculelor membranei, modificări determinate de mărimea şi direcţia sarcinii electrice ce traversează membrana.

III.5.3. Variaţii ale fluorescenţei şi absorbţiei de lumină

În afară de birefringenţă şi difuzia luminii, în legătură cu modificările structurale asociate cu impulsul nervos, se mai pot obţine informaţii şi pe baza studierii variaţiei fluorescenţei* axonilor colorati cu diferiţi coloranţi vitali. În principiu, pe această cale se pot obţine date foarte semnificative, în măsura în care pot fi găsiţi coloranţi vitali specifici care să formeze complexe numai cu anumiţi componenţi membranari. Pînă în prezent, au fost folosite acridinele, rodaminele, pironinele, anilinonaftalensulfonatul (ANS) (Tasaki şi colab., 1968; 1969 a). Este de remarcat că variaţiile de fluorescenţă observate atunci cînd sînt folosiţi unii coloranţi (de exemplu acridin-oranjul) sînt diametral opuse faţă de cele observate atunci cînd sînt folosiţi alţi coloranţi (de exemplu ANS), iar atîta timp cît nu sînt cunoscute natura şi proprietăţile complexelor realizate de aceşti colo-

* Fluorescenţa este proprietatea unor substanţe de a absorbi radiaţii cu anumite lungimi de undă şi de a emite alte radiaţii cu lungimi de undă mai mari (deci cu energie mai mică).

ranţi cu macromoleculele „receptoare" din membrana axonală de care se ataşează, nu se pot obţine informaţii structurale precise pe baza datelor de fluorescenţă.

Pentru înregistrarea fluorescenţei, nervul sau axonul gigant (colorat prin: injectare, perfuzie internă sau numai prin menţinere timp de 10 minute în soluţie cu colorant) este plasat într-o cameră de stimulare şi culegere din plastic negru, avînd transparentă numai o porţiune prin care preparatul este iluminat cu lumină cvasimonocromatică. Lumina emisă prin fluorescenţă de către nerv este culeasă la 90° de un fotomultiplicator, după ce trece printr-un filtru care înlătură lumina difuzată (sînt lăsate numai lungimile de undă cu cel puţin 20 nm mai mari decît radiaţia incidentă). Şi în acest caz, după amplificare, semnalul de la fotomultiplicator este trecut printr-un calculator de mediere.

Cu această metodologie, s-a constatat că fluorescenţa nervului de crab creşte rapid odată cu începerea potenţialului de acţiune, revenind la valoarea de repaus mai lent decît potenţialul. Variaţia relativă maximă este de $2 \cdot 10^{-5}$ din valoarea de repaus (Tasaki şi colab., 1969 b). Din studiile în condiţii de potenţial fixat (Conti şi Tasaki, 1970) s-a constatat că variaţia în timp a fluorescenţei axonilor colorați cu pironină şi rodamină este asemenea şi pentru pulsurile de depolarizare şi pentru cele de hiperpolarizare, variind însă ca sens şi amplitudine. Fluorescenţa axonilor colorați cu ANS variază paralel cu potenţialul de membrană, unui puls depolarizator corespunzîndu-i o scădere a intensităţii fluorescenţei, iar unui puls de hiperpolarizare o creştere a acesteia (Conti şi colab., 1971).

Cercetări din ultimii ani (Cohen şi colab., 1974; Ross şi colab., 1974) au arătat că există o serie de coloranţi vitali cu care este posibilă colorarea axonilor giganţi, astfel încît în timpul potenţialului de acţiune să apară o variaţie a intensităţii luminii absorbite de axon suficient de pronunţată pentru a fi detectată fără medierea mai multor semnale. Axonii giganţi, colorați prin incubare timp de 20 min în soluţia fiziologică conţinînd colorant (de exemplu, merociaonină), sînt iluminaţi cu un fascicul focalizat de lumină monocromatică cu lungimea de undă de 570 nm. Lumina transmisă, la aceeaşi lungime de undă, de un axon colorat este cu 30—50% mai puţin intensă decît pentru un axon necolorat. Atunci cînd axonul este stimulat, se produce o scădere a intensităţii luminii transmise, deci o creştere a absorbţiei,

Scanned with OKEN Scanner

într-un mod absolut paralel cu potenţialul de acţiune, aşa cum rezultă din fig. III.25.

Variaţiile relative ale intensităţii luminii transmise de axonul gigant în timpul excitaţiei sînt foarte mici, de ordinul a 10^{-4} din valoarea de repaus, însă raportul semnal/zgomot este mult mai bun decît pentru variaţiile de fluorescenţă, deoarece intensitatea de repaus a luminii transmise este cu cîteva ordine de mărime superioară faţă de intensitatea luminii de fluorescenţă.

În ceea ce priveşte originea acestor două fenomene optice asociate cu impulsul nervos, este foarte posibil ca ea să fie comună, acestea fiind două consecinţe diferite ale modificării micromediului în care se găsesc moleculele de colorant adsorbite pe membrană ca urmare a variaţiei potenţialului de membrană în cursul excitaţiei.

* * *

Toate fenomenele optice care însoţesc propagarea impulsului nervos reprezintă dovezi experimentale certe ale existenţei unor modificări structurale tranzitorii care se produc în membrana axonală în legătură cu activitatea ei electrică. Producerea de modificări structurale în membrană a trebuit să fie presupusă pentru a se explica variaţiile ample de permeabilitate din timpul potenţialului de acţiune. Fenomenele optice menţionate mai sus au adus deci o confirmare directă şi clară a acestei ipoteze care constituie unul dintre fundamentele teoriei ionice a excitaţiei. În ceea ce priveşte însă natura concretă a modificărilor structurale din mem-

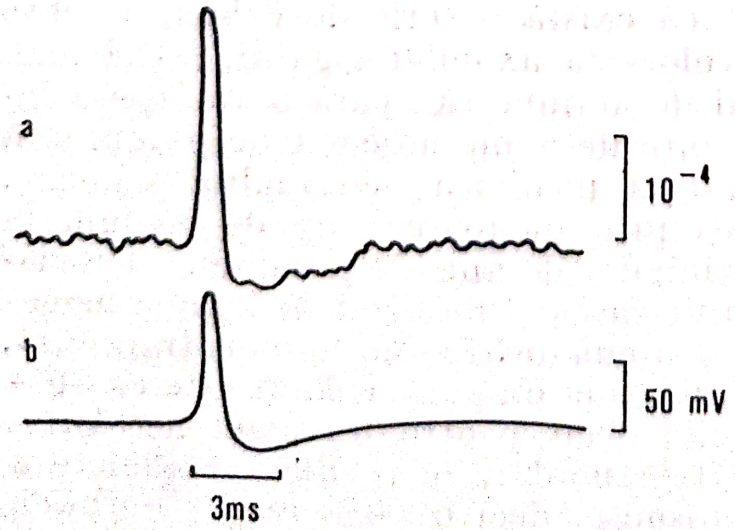


Fig. III.25. (după Ross şi colab., 1974) : Creşterea absorbţiei luminii cu $\lambda = 570$ nm (*a*) într-un axon gigant colorat, în timpul unui potenţial de acţiune (*b*).

brană, faptul dacă ele sînt asociate în mod direct cu deschiderea canalelor ionice sau dacă şi în ce mod participă la aceste modificări lipidele membranare, sînt încă probleme care îşi aşteaptă răspunsul. Oricum, se pare că studiul fenomenelor optice asociate cu propagarea impulsului nervos nu a dus încă la acele clarificări asupra fenomenelor moleculare din membrană pe care, în principiu, acest gen de studii le-ar putea oferi.

III.6. IPOTEZE ASUPRA MECANISMELOR IMPULSULUI NERVOS

În afară de cercetările experimentale şi teoretice care au dus la obţinerea de date noi asupra impulsului nervos, în ultimul deceniu au apărut şi unele încercări de elaborare a unor teorii care să explice mecanismele moleculare ale generării şi propagării excitaţiei în nerv, tinzînd să fie în concordanţă cu un număr cît mai mare de rezultate experimentale.

Pentru a contura o imagine cît mai reprezentativă a efortului actual de integrare a observaţiilor experimentale asupra impulsului nervos într-o teorie explicativă coerentă, capabilă să coreleze manifestările electrofiziologice şi celelalte fenomene care le însoţesc (optice, termice) cu procesele de la nivel molecular din nerv, vom prezenta principalele tentative făcute în acest sens.

Grupate după ideea de bază de la care pornesc, acestea sînt: ipotezele de tip biochimic, în care se consideră că impulsul nervos este rezultatul unor cicluri de reacţii enzimatice care au loc în membrana axonală şi care controlează proprietăţile ei de permeabilitate pentru ioni; ipotezele macromoleculare, ce pornesc de la tranziţiile conformaţionale apărute în macromoleculele din membrana axonală sub influenţa cîmpurilor electrice sau a modificărilor mediului ionic înconjurător, şi ipoteza dipolară a excitaţiei în care se consideră drept determinantă prezenţa unor straturi dipolare pe ambele suprafeţe ale membranei axonale.

Multitudinea ipotezelor referitoare la biofizica impulsului nervos ilustrează interesul acordat acestei probleme de a cărei rezolvare depinde înţelegerea de bază a funcţionării sistemului nervos. În acelaşi timp, varietatea acestor ipoteze reflectă, în mare parte, puncte de vedere destul de unilate-

rale (cum ar fi cel biochimic sau cel pur fizic) de la care se porneşte. De aceea, fără pretenţia de a tranşa *a priori* o problemă ştiinţifică foarte disputată, trebuie să observăm faptul că cele mai multe rezultate experimentale sînt conforme cu imaginea complexă de procese biofizice pe care se bazează teoria ionică a excitaţiei, dar că această imagine este încă incompletă.

III.6.1. Ipoteze biochimice

Înaintea altor lucrări mai recente, se cuvine să menţionăm ipoteza enzimatică elaborată de D. Nachmansohn în 1959, prima tentativă coerentă de a explica la nivel molecular procesele ce au loc în membrana axonală în timpul excitaţiei, ipoteză care stă la baza tuturor modelelor biochimice ale impulsului nervos.

Demonstrarea rolului esenţial al acetilcolinei (AcCh) ca mediator sinaptic şi faptul că în nervi există colinacetiltransferază (sistemul de sinteză a AcCh) l-au determinat pe Nachmansohn (1959) să propună o teorie bazată pe esenţialitatea AcCh pentru activitatea electrică celulară. După această teorie, depolarizarea, fie impusă de un stimul, fie determinată de curenţii locali, eliberează AcCh din forma sa legată de o proteină de stocaj (S) existentă în membrană. AcCh liberă se combină cu o altă proteină structurală a membranei, receptorul R, schimbîndu-i configuraţia. Ca rezultat, permeabilitatea membranei creşte şi se produc fluxurile ionice. Complexul AcCh—R este în echilibru dinamic cu AcCh şi cu R. AcCh liberă poate fi hidrolizată de către esteraza E şi astfel receptorul revine la configuraţia sa iniţială, iar permeabilitatea membranei scade. AcCh este apoi resintetizată de către colinacetil-transferază. Aceste etape sînt schematizate în fig. III.26.

O dovadă în sprijinul acestei teorii este prezenţa în diferite ţesuturi nervoase a AcCh, E şi colinacetil-transferazei. Pe de altă parte, absenţa E din majoritatea fibrelor senzitive din rădăcinile dorsale la mamifere pledează contra universalităţii rolului AcCh. Totuşi, chiar dacă rolul AcCh în excitabilitate nu este crucial, el este foarte important şi încă insuficient cunoscut. Teoria lui Nachmansohn a provocat o dispută ştiinţifică ce continuă încă. Astfel, Denburg şi colab. (1972) au arătat că chiar în axoni în care nu există

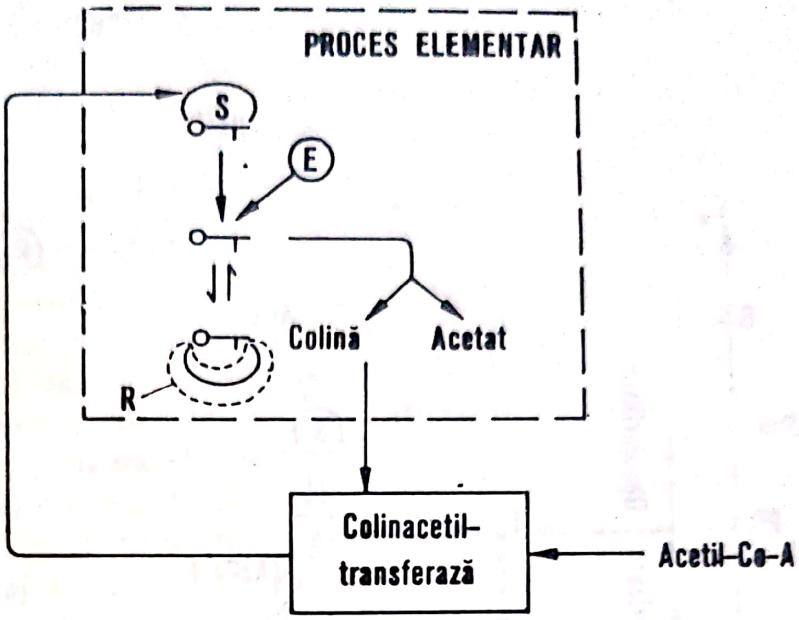


Fig. III.26. : Ipoteza inițială a lui Nachmansohn asupra rolului acetilcolinei în excitația membranei. *S* — proteina de stocaj a AcCh, *E* — acetilcolinesteraza care hidrolizează AcCh, *R* — molecula receptor care își schimbă conformația legînd AcCh.

receptorul pentru AcCh se află totuși un component, cu mare afinitate pentru nicotină, care seamănă din multe puncte de vedere cu receptorul AcCh, așa încît postulatul lui Nachmansohn cu privire la existența și rolul unei astfel de molecule pentru conducerea impulsului nervos „merită în continuare atenție".

În ultimii ani, D. Nachmansohn a elaborat împreună cu E. Neumann o nouă formă a ipotezei sale, prezentată drept o interpretare integrată a datelor biochimice și electrofiziologice asupra impulsului nervos (Neumann și colab., 1973; Nachmansohn, 1974; Nachmansohn și Neumann, 1975). Elementul principal nou, introdus în teoria biochimică a excitației, este presupunerea că proteina de stocaj a AcCh, receptorul și colinacetil-transferaza se găsesc în membrană sub formă de ansambluri — numite „unități de bază ale excitației" — care controlează deschiderea canalelor ionice. Existența unor astfel de ansambluri proteice este conformă cu imaginea actuală asupra structurii membranelor.

În fig. III.27, este redat (după Nachmansohn, 1974) ciclul de transformări biochimice — ciclul acetilcolinei, presupus că ar controla valoarea potențialului de membrană. O depolarizare de 15—20 mV induce o modificare conformațională $S_1 \rightarrow S_2$ a proteinei de stocaj, astfel eliberîndu-se

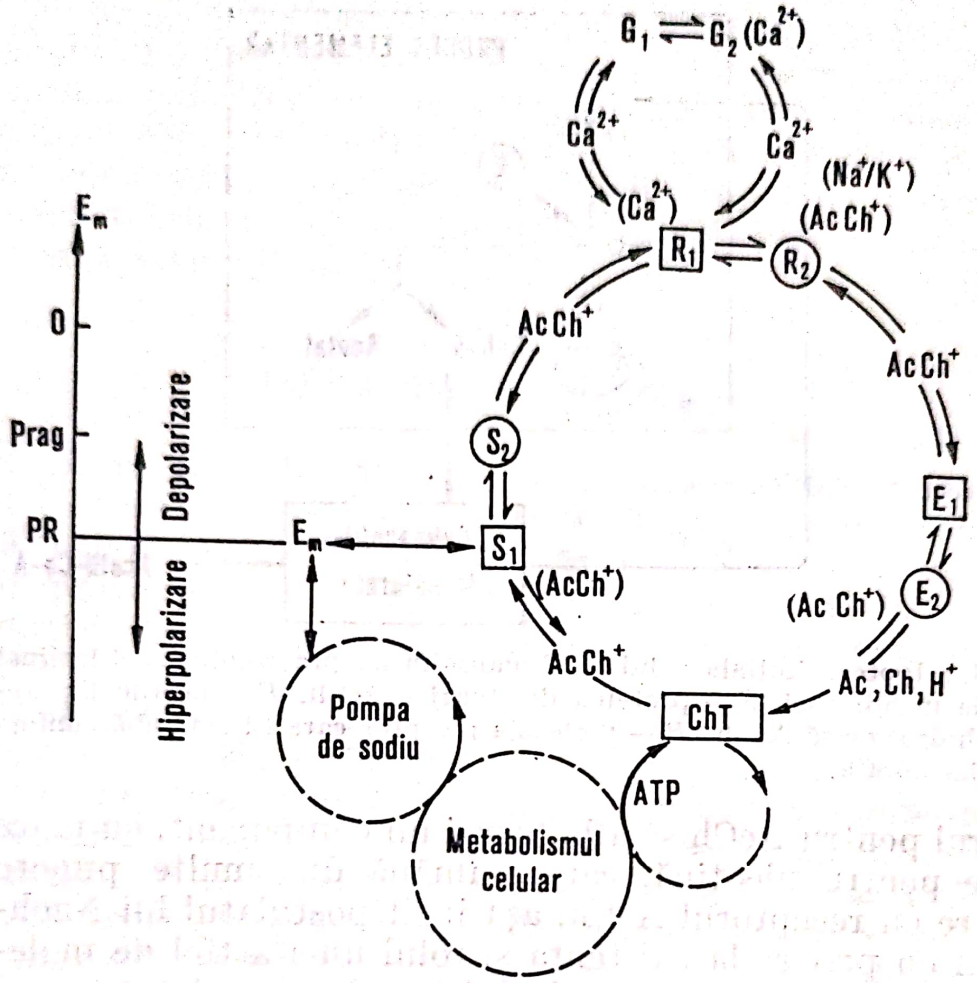


Fig. III.27. (după Nachmansohn, 1974): Forma recentă a ciclului de transformări prin care AcCh ar controla potențialul de membrană. Semnificația simbolurilor *S*, *E* și *R* este aceeași ca în fig. III.26., numai că se presupun cîte doi componenți; *G* este particula cu rol de canal ionic, deschis în conformația G_1 și închis atunci cînd leagă calciu; ChT este colinacetiltransferaza.

AcCh care este transferată receptorului R. Asociindu-se cu acetilcolina, receptorul își modifică propria conformație, $R_1 \rightarrow R_2$, eliberînd ionii de calciu. Prin aceasta se deschide canalul ionic: $G_2 \rightarrow G_1$. Simultan, AcCh-esteraza (E) hidrolizează AcCh în colină, acetat și protoni. Pentru resinteza AcCh de către colinacetil-transferază este nevoie de energie sub formă de ATP, furnizată de metabolismul celular. Se presupune că aceste procese au loc în mod continuu și în starea de repaus, dar că în activitate viteza lor este mult mărită.

După cum am menționat anterior, teoria biochimică a excitației pornește de la constatarea (dealtfel uneori contestată) a prezenței unor cantități considerabile de receptor

de AcCh şi de AcCh-esterază în membranele excitabile, ca şi de la faptul că blocarea receptorului de AcCh cu antimetaboliţi ai aceticolinei, aşa cum sînt anestezicele locale, abolește activitatea electrică. Acest model rămîne totuşi neconvingător, căci: a) nu propune vreo modalitate suficient de bine definită prin care ciclul de transformări biochimice să se cupleze cu fluxurile de ioni, simpla referire la tranziţiile conformaţionale fiind prea vagă pentru a putea permite o tratare cantitativă prin care modelul să poată fi testat experimental; b) se vorbeşte de canale ionice în general, fără a se ţine seama că acestea sînt diferite pentru sodiu şi pentru potasiu; c) nu există dovezi certe că propagarea excitaţiei în membrana axonală este însoţită de transformări biochimice şi, cu atît mai mult, că în toate cazurile acestea ar implica acetilcolina.

Există şi modele moleculare bazate pe cicluri biochimice, în cazul cărora obiecţiile a) şi b) de mai sus nu se aplică (Gillespie, 1973; Dubois şi Schoffeniels, 1974). Astfel, Dubois şi Schoffeniels (1974) consideră că pentru fiecare din cele două tipuri de canale ionice (pe care ei le consideră ionofori) există cîte un ciclu biochimic: un ciclu al acetilcolinei pentru ionoforii sodiului şi un ciclu al calciului pentru ionoforii potasiului (fig. III.28). Ca şi în ipoteza lui Nachmansohn, se consideră că o tranziţie conformaţională indusă de variaţia de cîmp electric eliberează AcCh din forma ei de stocaj şi că AcCh liberă se leagă de o moleculă receptor care controlează conductanţa pentru sodiu a membranei, fiind ionoforul sodiului. Aceste tranziţii şi formări de complexe, ca şi hidroliza AcCh de către esterază depind nu numai de cîmpul electric, ci şi de prezenţa ionilor liberi de calciu. Despre calciu, se presupune că este legat de o proteină care controlează conductanţa pentru potasiu a membranei, după desfacerea calciului această proteină funcţionînd ca ionofor al potasiului. Complexele respectivei proteine cu calciul se desfac atunci cînd scade potenţialul transmembranar şi se refac numai sub influenţa unei enzime specifice de transport (ATP-aza calciului).

Scriind ecuaţiile cineticii acestor transformări, Dubois şi Schoffeniels au putut ca, prin integrare numerică (cu calculatorul), să reproducă variaţia conductanţelor ionice şi a potenţialului transmembranar în cursul impulsului nervos

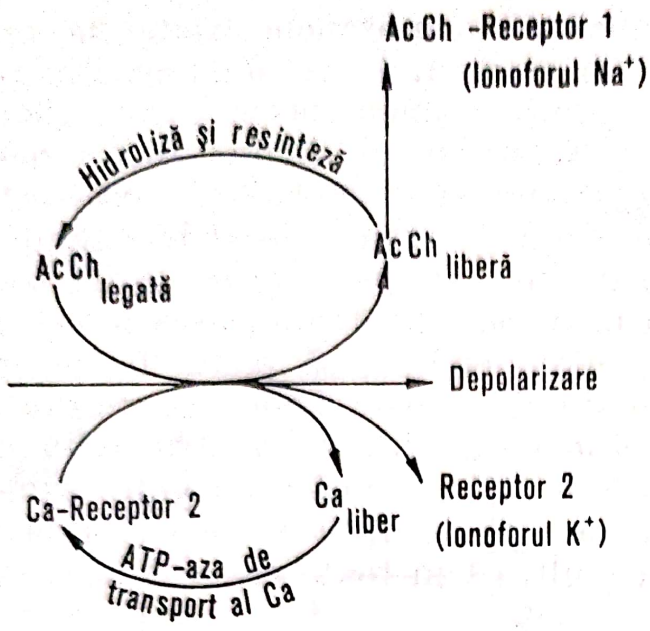


Fig.III.28.: Ciclurile biochimice presupuse de către Dubois și Schoffeniels (1974) că ar controla ionoforii de sodiu și de potasiu din membrana axonală.

cu aceeași acurateţe ca și în cazul integrării ecuaţiilor Hodgkin-Huxley. Acest succes arată că, în principiu, este posibil ca printr-o schemă de transformări biochimice să fie redate fenomenele de bioelectricitate, dar concordanţa calculelor acestor autori cu datele electrofiziologice provine dintr-o alegere relativ arbitrară a parametrilor numerici utilizaţi la integrarea ecuaţiilor cinetice. De asemenea, ipoteza vehiculării sodiului și potasiului de către ionofori (și nu trecerea prin canale) este greu compatibilă cu intensitatea foarte ridicată a traversării membranei de către ioni în timpul excitaţiei (§ II.1.3 și III.4.1).

III.6.2. Ipoteze macromoleculare

Există cîteva ipoteze asupra mecanismului excitaţiei și conducerii în nerv care explică aceste procese pe baza fenomenelor ce au loc în ansambluri de macromolecule, în care se produc tranziţii determinate fie de mediul ionic înconjurător, fie de cîmpurile electrice aplicate din exterior.

Goldman (1964) a propus o bază structurală a proceselor de excitaţie, considerînd membrana drept un mediu continuu inert pe a cărui suprafaţă externă este un strat de locuri schimbătoare de ioni legate de moleculele fosfolipidice. Aceste locuri se comportă ca „porţi" prin care intră ionii ce vor fi împinși prin membrană de forţe electrice și de difuzie. De-

oarece excitabilitatea este abolită de fosfolipazele care atacă stratul lipidic trecînd prin zona proteică a membranei, rezultă că prin această zonă pot trece chiar unele molecule mari şi, cu atît mai mult, ionii Na^+ şi K^+. Goldman trage deci concluzia că fluxurile ionice prin membrana axonală sînt controlate de către stratul lipidic bimolecular. Acesta este format din colesterol, galactozide şi fosfolipide. Lanţurile hidrocarburice ale acestora sînt îndreptate către interiorul membranei, iar grupările polare sînt în contact cu proteinele pe ambele feţe. Atunci cînd nu sînt legate, aceste grupări constituie dipoli ce pot fi orientaţi de un cîmp electric, ceea ce face ca acest strat să determine procesele ce au loc în timpul potenţialului de acţiune. Interiorul membranei este considerat un mediu relativ inert, deoarece lanţurile hidrocarburice sînt aproape complet saturate. Stratului proteic nu îi este atribuit un rol major în excitaţie, deoarece enzimele proteolitice aplicate în exteriorul membranei nu afectează sensibil excitabilitatea.

În cadrul unui ciclu de lucrări asupra reacţiilor transformatoare de energie în membranele biologice, Weiss (1969) a descris modificările de permeabilitate ce au loc în membrana axonală în timpul potenţialului de acţiune ca fenomene de schimb de ioni. Curentul electric excitator induce o dilatare tranzitorie a unui polimer schimbător de ioni, a cărui tranziţie conformaţională îi schimbă selectivitatea ionică şi întinde lipidele membranare. Proprietăţile contractile ale acestora participă la readucerea membranei în starea iniţială. În model se presupune că există o fosfolipopeptidă care creează centre schimbătoare de ioni în membrană, locuri prin care pot trece ionii. Interacţiile Van der Waals dintre hidrocarburile lipidelor şi componenţii vecini din membrană formează straturi bimoleculare cu proprietăţi contractile. În starea contractată, aceste „resorturi moleculare" pot accepta ionii K^+, Rb^+, Cs^+, însă numai nehidrataţi. Deci, potasiul, care este mai puţin hidratat, este acceptat cu precădere în această stare. În starea extinsă a resorturilor, cel mai uşor pot fi acceptaţi Na^+ şi Li^+ hidrataţi. În această stare, straturile bimoleculare contractile au o structură mai ordonată în care rotaţia liberă a segmentelor hidrocarburice este împiedicată, aşa încît se dezvoltă o tensiune de contracţie care împiedică dilatarea ulterioară.

Deşi fosfolipidele de tipul celor presupuse că ar acţiona ca resorturi moleculare sînt prezente în ţesutul nervos, nu

Scanned with OKEN Scanner

există încă vreo dovadă experimentală că ele ar fi asociate cu transportul de cationi în membrane. Cele două încercări de explicare moleculară a potenţialului de acţiune sînt numai nişte modele insuficient elaborate şi verificate, care însă ar putea conţine idei utile pentru o teorie biofizică a excitaţiei.

I. Tasaki şi colaboratorii săi au elaborat o teorie a excitaţiei bazată tot pe procese ce au loc într-un ansamblu macromolecular. Cunoscută ca „teoria celor două stări stabile" (Tasaki, 1968), această concepţie se bazează pe un variat ansamblu de date experimentale. Liniile de bază ale teoriei celor două stări stabile sînt următoarele :

Membrana este considerată un sistem macromolecular complex de proteine şi fosfolipide. O diagramă schematică a membranei axonului gigant de calmar, construită pe baza datelor electrofiziologice obţinute prin tehnica de perfuzie internă, este reprodusă în fig. III.29., după Tasaki (1968).

Bariera de difuzie a membranei excitabile a axonului este un cadru de macromolecule lipoproteice. În ea se disting, din punctul de vedere al funcţiei biofizice, două straturi : stratul extern, care posedă grupări încărcate negativ, probabil de natură carboxilică, cu densitate relativ mare. În starea de repaus a membranei aceste locuri sînt ocupate mai ales de cationi bivalenţi luaţi din mediul extern ; stratul intern, care conţine tot grupări încărcate negativ, posibil de natură fosfatică, dar cu densitate relativ scăzută. În repaus aceste locuri sînt ocupate mai ales de cationi monovalenţi luaţi din interiorul axonului.

Procesul de excitare este considerat ca fiind manifestarea tranziţiilor macromoleculelor membranei din conformaţia

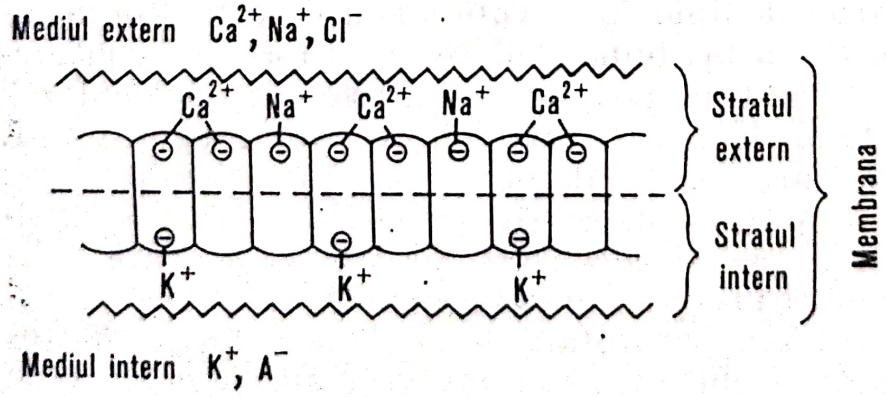


Fig. III.29. : Ipoteza lui Tasaki asupra alcătuirii membranei axonului gigant, ca un ansamblu macromolecular de fosfolipide avînd sarcini negative fixe şi proteine în conformaţie neglobulară.

stabilă de repaus într-o altă conformaţie stabilă, „de activitate". În condiţii experimentale obişnuite, astfel de tranziţii sînt produse de o scădere a raportului dintre cationii bivalenţi şi cei monovalenţi în stratul extern al membranei. Modul cel mai simplu de a schimba acest raport este de a-l modifica în mediul extern, deci „excitaţie chimică".

Tranziţii ale macromoleculelor membranei pot fi produse şi de un curent electric. În starea de repaus cationii bivalenţi (Ca^{2+}, Mg^{2+}) formează în stratul extern complexe relativ stabile cu macromoleculele membranei. Ionii mici ai metalelor alcaline (Li^+, Na^+) au numai o slabă afinitate pentru locurile negative fixe şi o mică tendinţă de a rupe aceste legături ale cationilor bivalenţi cu macromoleculele. Însă cationii mai mari ai metalelor alcaline (K^+, Rb^+, Cs^+) au o tendinţă puternică de a rupe aceste complexe, probabil datorită afinităţii lor mult mai mari faţă de grupările carboxilice. Această rupere duce la o alterare a conformaţiei macromoleculelor (fig. III.30).

În cazul stimulării electrice, deci a trecerii prin membrană a unui curent electric îndreptat spre exterior, cationii monovalenţi K^+, Rb^+, Cs^+ sînt împinşi din interiorul axoplasmei în membrană. Ei sînt capabili să rupă complexele macromoleculelor cu calciul, aşa încît se produce tranziţia macromoleculelor în conformaţia stabilă de activitate. Un curent îndreptat în sens contrar împinge Na^+ şi Li^+ din exterior în membrană, dar aceşti ioni nu pot rupe complexele macromoleculelor cu calciul, deci nu pot produce excitaţia.

După Tasaki, ruperea complexelor macromoleculare cu Ca^{2+} este un proces cooperativ, aşa încît ruperea unui astfel de complex duce la formarea unei foarte mici „zone active"

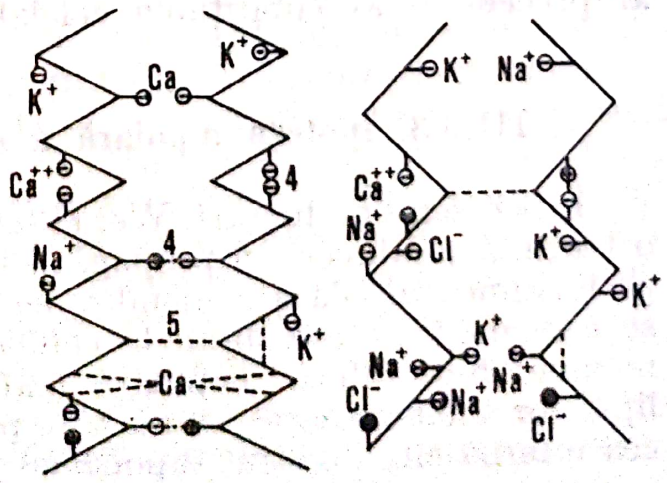


Fig. III.30. (după Tasaki, 1968): Trecerea macromoleculelor membranare din conformaţia compactă în aceea mai permeabilă prin ruperea complexelor cu calciul.

în care s-au rupt toate complexele. Formarea unei zone active în membrană generează un curent electric local îndreptat spre exterior prin suprafața în repaus și spre interior prin zona activă, în felul acesta propagîndu-se excitația.

În fibra nervoasă are loc o interdifuzie rapidă a cationilor externi și interni atunci cînd membrana este în starea activă. Interdifuzia determină o schimbare gradată a compoziției ionice, producîndu-se tranziția conformațională a macromoleculelor înapoi la conformația de repaus, deci potențialul de acțiune încetează.

Ipoteza celor două stări stabile caută să ofere o bază fizică plauzibilă pentru modificările conductanțelor ionice ale membranei axonale în timpul activității. Ea permite înțelegerea calitativă a rezultatelor experimentale privind efectul diferiților ioni asupra excitabilității și modificările optice (de fluorescență, birefringență și difuzia luminii) asociate cu impulsul nervos. Din păcate, însă, această ipoteză nu are o elaborare cantitativă care să permită compararea cu experiența a unor valori prezise teoretic. Un aspect fundamental al acestei ipoteze, foarte dificil de acceptat în prezent, este acela că trecerea ionilor prin membrană este considerată în mod uniformist, prin toată suprafața, nu prin porțiuni specializate (canale). În sfîrșit, mai remarcăm și faptul că în mod implicit se presupune că desprinderea calciului de membrană precede fluxurile de sodiu și potasiu. Se știe, într-adevăr, de mult timp că în cursul excitației are loc un influx de calciu în axoplasmă. Acest influx constă însă dintr-o componentă rapidă pe care o poate bloca TTX, deci care trece prin canalele sodiului și o componentă tardivă prin canale specifice pentru calciu (Baker și Glitsch, 1975), așa încît nu se poate susține că deplasarea calciului ar precede și ar condiționa celelalte fluxuri ionice.

III.6.3. Ipoteza dipolară a excitației nervoase

Într-o serie de lucrări, Wei (1969 ; 1971 ; 1974) a elaborat o teorie a producerii și propagării impulsului nervos, bazată pe imaginea dipolară a membranei celulare, în cadrul căreia se consideră că membranele celulare sînt alcătuite dintr-o regiune hidrofobică nepolară (catenele hidrocarburice ale lipidelor membranare) avînd atît pe fața externă, cît și pe cea internă cîte un strat dipolar cu grosimea $s = 10$ Å. Stra-

turile dipolare, cu polii negativi spre exteriorul membranei, constau din grupările hidrofile ale fosfolipidelor care sînt principalul component membranar (grosimea totală a membranei este de ≈ 100 Å).

Ţinînd seama de faptul că în timpul excitaţiei are loc o pătrundere a sodiului prin membrană, Wei afirmă că stările de repaus şi de excitaţie ale membranei sînt determinate de o aşa-numită „condiţie a forţelor" care acţionează asupra ionilor Na^+, adică de sensul în care este îndreptată rezultanta tuturor forţelor ce acţionează asupra acestor ioni.

Luînd pentru bariera de potenţial creată de stratul dipolar extern valoarea $E_e = 20$ mV, rezultă că asupra unui ion Na^+ acţionează forţa electrică: $f_1 = -(1e^+) \cdot E_e/s = -2 \cdot 10^5$ eV/cm, semnul (—) indicînd sensul spre exterior al acestei forţe.

Asupra fiecărui ion Na^+ mai acţionează şi o forţă de difuzie: $f_2 = kT$ grad $\ln(Na) = 6 \cdot 10^4$ eV/cm, deci în ansamblu, la limita barierei dipolare asupra unui ion Na^+ acţionează forţa: $F(Na) = f_1 + f_2 = -1{,}4 \cdot 10^5$ eV/cm. În starea de repaus ionii de sodiu sînt deci împiedicaţi de către bariera dipolară să pătrundă în interiorul membranei. Excitaţia poate fi produsă fie reducînd f_1, deci pe cale electrică, fie crescînd f_2, deci pe cale chimică, fie intervenind cu o altă forţă f_3, aşa încît: $f_1 + f_2 + f_3 > 0$.

Bariera de potenţial E_e, creată de stratul dipolar extern, este determinată de orientarea unui număr mai mare de dipoli cu polul (—) spre exterior, decît în sens invers. Dacă cele două populaţii de dipoli sînt N_1 şi N_2 (pe unitatea de suprafaţă), iar sarcina electrică a fiecărui pol este q, atunci: $E_e = (N_1 - N_2) \cdot q/\varepsilon s$, unde ε este permitivitatea mediului. Se vede că schimbarea populaţiilor de dipoli cu cele două orientări opuse determină modificarea barierei de potenţial E_e, conform formulei de mai sus. Aplicînd un cîmp electric extern, la catod o parte din dipolii orientaţi cu polul (—) spre exterior vor fi rotiţi în sens invers, aşa încît N_1 scade şi N_2 creşte. Cînd E_e a scăzut suficient ca f_1 să fie mai mică decît f_2, ionii Na^+ sînt împinşi spre interiorul fibrei şi apare excitaţia. Propagarea excitaţiei ar decurge prin emiterea de cuante de energie de către dipolii dintr-o zonă activă atunci cînd revin pe nivelul energetic de bază. Aceste cuante sînt absorbite de dipolii învecinaţi care se rotesc ş.a.m.d.

Hamel şi Zimmerman (1970) au reuşit să deducă teoretic comportarea conductanţei membranei în timpul excita-

ţiei, pe baza unui model dipolar în care sînt considerate tranziţiile cooperative din stratul dipolar de suprafaţă al membranei sub influenţa unui cîmp electric extern şi nu rotaţiile individuale ale dipolilor, ca în teoria lui Wei.

Se observă clar faptul că ipoteza dipolară tinde să acrediteze o imagine eminamente fizică asupra mecanismului excitaţiei şi conducerii impulsului nervos, tratînd aceste procese biofizice drept rezultate ale tranziţiilor dipolilor de la suprafaţa membranei axonale între două nivele energetice. Fenomenele electrice, optice şi termice care se produc în nerv în timpul activităţii apar ca manifestări macroscopice ale tranziţiilor cuantificate ale dipolilor. Astfel, modificarea barierei de potenţial electric (în urma acestor tranziţii) apare ca potenţial de acţiune; reorientările dipolare modifică indicii de refracţie şi deci birefringenţa; revenirea dipolilor pe nivelul energetic inferior poate produce o emisie în infraroşu, iar pe măsură ce cîmpul electric se modifică, variază şi energia dipolilor, aceasta putînd da naştere unei emisii şi absorbţii de căldură (cap. VI).

Ideea căutării unei *origini* a impulsului nervos, adică a unui proces de bază prin care să se explice toate fenomenele asociate acestuia este desigur în logica obişnuită a aprofundării cunoaşterii în orice domeniu, iar participarea dipolilor membranari la generarea şi propagarea impulsului nervos este presupusă în numeroase alte explicaţii (de exemplu, pentru deschiderea şi închiderea canalelor ionice). Cu toate acestea, ipoteza lui Wei se bucură de relativ puţină atenţie datorită caracterului ei evident unilateral. Fără a intra într-o analiză mai detaliată, remarcăm faptul că membrana excitabilă este tratată tot într-un mod uniformist (ca şi în teoria lui Tasaki), neţinîndu-se seama de caracterul specializat şi complex al zonelor prin care ionii o pot traversa; nu se face referire la selectivitatea ionică a membranei şi la originile posibile ale acestei selectivităţi şi nu se atribuie vreun rol metabolismului celular sugerîndu-se vreo modalitate prin care se reglează distribuţia ionilor în axoplasmă.

* * *

În afara lucrărilor prezentate mai sus, există numeroase alte tentative de a explica biofizica impulsului nervos, fie presupunînd că membranele axonale au conductibilitate electronică şi nu ionică (Ernst, 1956; Wei, 1967; Bockris,

1969), fie considerînd că în excitaţia nervoasă este implicat efectul Wien de disociere a unor electroliţi membranari sub influenţa cîmpului electric aplicat (Bass şi Moore, 1968). S-a sugerat chiar posibilitatea propagării în membrana axonală a unei unde de perturbaţie mecanică sincronă cu impulsul electric (Lundström, 1974). Prin perturbaţie mecanică nu trebuie înţeleasă în acest caz o deformare macroscopică, ci deplasarea unor molecule membranare, aşa cum se presupune în cazul deschiderii canalelor ionice şi cum o arată modificările optice care însoţesc impulsul nervos.

Obiectivul paragrafelor anterioare este de a schiţa o prezentare a numeroaselor tentative de explicare a celor mai profunde mecanisme ale impulsului nervos, tentative a căror varietate atestă atît complexitatea problemei, cît şi importanţa ei. Pentru ca, încheind acest capitol, să avem o imagine a stadiului actual şi a direcţiilor principale de desfăşurare a cercetărilor referitoare la generarea şi propagarea impulsului nervos, vom delimita mai jos principalele achiziţii experimentale şi interpretarea care apare în prezent drept cea mai plauzibilă.

III.6.4. Mecanismele biofizice implicate în teoria ionică a excitaţiei

Teoria ionică a excitaţiei consideră că impulsul nervos (potenţialul de acţiune) este un fenomen asociat în mod nemijlocit cu membrana celulelor excitabile: în starea de repaus membrana are o permeabilitate ionică scăzută, fiind totuşi de aproximativ 10 × mai permeabilă pentru potasiu decît pentru sodiu, iar ca urmare a stimulării se produce o creştere tranzitorie atît a permeabilităţii pentru sodiu, cît şi pentru potasiu, dar cu o cinetică diferită în timp; membrana este traversată de un flux de sodiu spre interiorul celulei excitabile şi de un flux de potasiu spre exterior. Aceşti curenţi ionici propagă excitaţia de-a lungul membranei în mod recurent de la o zonă la alta, iar în cazul fibrelor nervoase mielinizate, în mod saltatoriu de la un nod Ranvier la altul şi fac ca distribuţia ionică în interiorul celulei să se modifice, acumulîndu-se sodiu în axoplasmă. Rolul metabolismului este de a menţine şi reface compoziţia ionică normală, cu mult potasiu şi puţin sodiu în axoplasmă, deci de a menţine gradienţii de potenţial electrochimic ce constituie

sursa imediată de energie pentru propagarea excitației. Deși această imagine asupra impulsului nervos a apărut mult timp ca pur descriptivă, dedusă aproape exclusiv din datele electrofiziologice și fără o legătură evidentă cu mecanisme de nivel molecular, se poate constata astăzi că toată acumularea de cunoștințe de după 1952* nu numai că nu o contrazice, ci îi oferă teoriei ionice fundamentarea explicativă care inițial îi lipsea.

Faptul că un axon gigant golit de axoplasmă, care a rămas numai ca o membrană (cu o peliculă foarte subțire de axoplasmă în interior) poate ca, atunci cînd este perfuzat cu o soluție salină adecvată, să conducă impulsuri indiscernabile din punct de vedere electric cu cele dintr-un axon intact atestă că impulsul nervos este nemijlocit asociat cu membrana. Atunci cînd de cele două părți ale unei membrane axonale sînt soluții saline cu aceeași compoziție nu se mai pot produce impulsuri nervoase căci lipsesc gradienții de potențial electrochimic care să „împingă" prin membrană fluxurile de ioni.

În cadrul modelului membranei celulare ca „mozaic fluid de lipide și proteine globulare" este ușor de conceput că unele proteine intrinseci constituie sistemele moleculare pentru pompajul ionic contra gradienților de potențial odată cu hidroliza ATP furnizat de metabolismul celular, iar altele constituie canalele care se deschid ca urmare a stimulării și prin care ionii trec în mod pasiv, împinși de gradienții de potențial electrochimic. Există substanțe care blochează în mod specific „pompele" ionice, fără să afecteze direct funcția de excitabilitate (deci canalele) și substanțe care blochează conducerea impulsului, fără să afecteze transportul activ de ioni. Din punctul de vedere al mecanismului de traversare a membranei de către ioni, „pompele" sînt ionofori, adică transportori care pot vehicula un număr mai mic de ioni decît cei ce trec prin canalele care sînt „pori", adică „miezul" hidrofil al unor ansambluri proteice care traversează stratul lipidic al membranei. De aceea, numărul de „pompe" este mai mare decît al canalelor ionice distribuite din loc în loc pe suprafața membranelor excitabile.

Sodiul și potasiul (și chiar alți ioni) traversează membrana în timpul excitației prin canale separate care pot fi blocate

---

* Ciclul de articole de A. L. Hodgkin, A. F. Huxley și B. Katz, publicate în acel an, conțin formularea aproape completă a teoriei ionice a excitației.

Scanned with OKEN Scanner

în mod specific și a căror extracție separată din membrane și apoi reconstituire în filme lipidice bimoleculare sînt în curs de realizare. Atît canalele sodiului, cît și cele ale potasiului prezintă o porțiune cu rol de filtru de selectivitate, capabilă ca, din motive sterice și energetice, să lase să treacă numai respectivul tip de ioni. Deschiderea canalelor ionice în funcție de potențialul electric transmembranar este controlată de un sistem „de poartă" constînd din sarcini electrice sau dipoli capabili să sufere deplasări intramembranare. Atît deplasările intramembranare ale moleculelor încărcate electric, cît și în general toate procesele legate de permeabilizarea membranei reprezintă tranziții conformaționale în cadrul acesteia. Natura intimă a acestor procese nu poate fi însă înțeleasă fără o cunoaștere detaliată a structurii moleculare a canalelor, de care nu dispunem încă (Goldman, 1976).

În afara fluxurilor ionice de sodiu și de potasiu, în timpul excitației mai sînt și fluxuri transmembranare ale altor ioni, de exemplu de calciu. Rolul predominant al acestuia este de a cupla excitația electrică cu alte activități celulare, de exemplu cu exocitoza veziculelor cu mediator sinaptic sau cu contracția musculară.

Conducerea unui număr de impulsuri face ca din axoplasmă să iasă potasiu și să se acumuleze sodiu (fapt dovedit cu izotopi radioactivi) și determină o intensificare a activității pompelor ionice (care sînt ATP-aze activate de către sodiu și potasiu) și deci un consum sporit de energie metabolică evidențiat printr-o creștere a consumului de oxigen și a degajării de căldură (capitolul IV).

Se observă deci că teoria ionică a excitației reușește să încadreze într-un ansamblu coerent principalele progrese realizate în biofizica celulelor excitabile în general și a fibrelor nervoase în particular. Eforturile actuale și de perspectivă în acest domeniu vizează aprofundarea descifrării mecanismelor moleculare ale impulsului nervos în așa măsură, încît ecuațiile care descriu acest fenomen să nu mai conțină parametri empirici, ci deduși în cadrul unei teorii explicative. Pentru o adevărată înțelegere a impulsului nervos, a mecanismelor sale, va trebui ca acest fenomen biofizic complex să fie încadrat în mod coerent în dinamica celulară generală a neuronului, stabilindu-se corelațiile reciproce cu metabolismul celular în sensul cel mai larg. Este de asemenea foarte probabil ca aprofundarea cercetărilor privind participarea

Scanned with OKEN Scanner

apei în excitaţia nervoasă (Vasilescu, 1971) să deschidă o perspectivă promiţătoare pentru abordarea proceselor de nivel submolecular prin care se realizează această funcţie biologică.

BIBLIOGRAFIE

A. Referinţe generale

BRINLEY, F. J., JR. (1974), Ch. 2 în *Medical Physiology* (vol. I), V. B. MOUNTCASTLE (ed.), C. V. Mosby Co., Saint-Louis.

COLE, K. S. (1968), *Membranes, Ions and Impulses*, Univ. of California-Press, Berkeley.

GOUGEROT, L. (1973), *Électricité, électrophysiologie, électronique*, Masson, Paris.

HODGKIN, A. L. (1964), *The Conduction of the Nervous Impulse*, Liverpool Univ. Press, Liverpool.

KATZ, B. (1966), *Nerve, Muscle and Synapse*, McGraw Hill, New York.

LÜTTGAU, H. C., GLITSCH, H. (1976), *Membrane Physiology of Nerve and Muscle Fibres*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

B. Referinţe speciale

ARMSTRONG, C. M. (1975), „Quart. Rev. Biophys.", *7*, 179.

ARMSTRONG, C. M., BINSTOCK, L. (1965), „J. Gen. Physiol.", *48*, 859.

ARMSTRONG, C. M., BEZANILLA, F. (1973), „Nature", *242*, 459.

ARMSTRONG, C. M., BEZANILLA, F. (1974), „J. Gen. Physiol.", *63*, 533.

BAKER, P. F., GLITSCH, H. G. (1975), „Phil. Trans. R. Soc. Lond.", *B 270*, 389.

BASS, L., MOORE, W. J. (1968), în *Structural Chemistry and Molecular Biology*, A. RICH şi N. DAVIDSON (ed.), Freeman, San Francisco.

BERESTOVSKY, G. M., LUNEVSKY, V. Z., RAJIN, V. D., MUSIENKO, V. C. (1969), „Dokladî Acad. Nauk SSSR", *189*, 203.

BERESTOVSKY, G. M., LIBERMAN, E. A., LUNEVSKY, V. Z., FRANK, G. M. (1970), „Biofizika", *15*, 62.

BEZANILLA, F., ARMSTRONG, C. M. (1972), „J. Gen. Physiol.", *60*, 588.

BOCKRIS, J. O'M. (1969), „Nature", *224*, 775.

COHEN, L. B., KEYNES, R. D. (1969), „J. Physiol.", *204*, 100 P.

COHEN, L. B., LANDOWNE, D. (1970), în *Biophysics and Physiology of Excitable Membrane, W. J. Adelman* (ed.), Van Nostrand, New York.

COHEN, L. B., KEYNES, R. D. (1971), „J. Physiol.", *212*, 259.

COHEN, L. B., KEYNES, R. D., HILLE, B. (1968), „Nature", *218*, 438.

COHEN, L. B., HILLE, B., KEYNES, R. D. (1970), „J. Physiol.", *211*, 495.

MĂRGINEANU, D.-G. (1972), „Experientia" *28*, 1286.

NACHMANSOHN, D. (1974), în *Biochemistry of Sensory Function*, L. JAENICKE, (ed.), Springer Verlag, Berlin.

NACHMANSOHN, D. NEUMANN, E. (1975), *Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity*, Academic Press, New York.

NAKAMURA, Y., NAKAJIMA, S., GRUNDFEST, H. (1965), „J. Gen. Physiol." *48*, 985.

NARAHASHI, T., HAAS, H. G., THERRIEN, E. F. (1964), „Science", *157*, 1441.

NARAHASHI, T., MOORE, J. W., SCOTT, W. R. (1967), „J. Gen. Physiol.". *47*, 965.

NEUMANN, E., NACHMANSOHN, D., KATCHALSKY, A. (1973), „Proc. Natl. Acad. Sci. USA", *70*, 727.

NOBLE, D. (1966), „Physiol. Rev.", *46*, 1.

POUSSART, D. J. M. (1971), „Biophys. J.", *11*, 211.

ROSS, W. N., SALZBERG, B. M., COHEN, L. B., DAVILA, H. V. (1974), „Biophys. J.", *14*, 983.

SEGAL, J. R. (1969), „J. theor. Biol.", *24*, 159.

TAKASHIMA, S. (1976), „J. Membrane Biol.," *27*, 21.

TASAKI, I. (1968), *Nervous Excitation: A Macromolecular Approach*, C. C. Thomas, Springfield I 11.

TASAKI, I., WATANABE, A,. SANDLIN, R., CARNAY, L. (1968), „Proc. Nat. Acad. Sci. USA", *61*, 883.

TASAKI, I., CARNAY, L., WATANABE, A. (1969 a), „Proc. Nat. Acad. Sci. USA", *64*, 1362.

TASAKI, I., CARNAY, L., SANDLIN, R., WATANABE, A. (1969 b), „Science", *163*, 683.

TAYLOR, R. E. (1963), în *Physical Techniques in Biological Research*, vol. VI B, W. L. NASTUK (ed.), Academic Press, New York.

VASILESCU, V. (1971), în *Proc. 1st. Europ. Biophysics Congress* Vienna, E. BRODA, A. LOCKER, H. SPRINGER-LEDERER (eds.), p. 507.

VERVEEN, A. A., DE FELICE, L. J. (1974), „Progr. Biophys. molec. Biol.", *28*, 191.

WEI, L. (1967), „Bull. Math. Biophys.", *29*, 411.

WEI, L. (1969), „Science", *163*, 280.

WEI, L. (1971), „Bull. Math. Biophys.", *33*, 187.

WEI, L. (1974), „Ann. N. Y. Acad. Sci.", *227*, 285.

WEISS, D. E. (1969), „Australian J. Biol. Sci.", *22*, 1355.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL IV

METABOLISMUL ENERGETIC ŞI PROBLEMELE TERMODINAMICE ALE FUNCŢIONĂRII NERVULUI

Faptul că funcţia evidentă a fibrelor nervoase este transmiterea informaţiei prin secvenţe de impulsuri electrice şi nu conversia de energie, ca de exemplu în cazul fibrelor musculare, a făcut ca aspectul energetic al activităţii nervoase să fie mult mai puţin studiat, în raport cu manifestările electrice asociate excitaţiei. Însă studierea transformărilor de energie implicate în orice fenomen biologic este o componentă majoră a abordării biofizice a acelui fenomen, în cazul funcţionării nervului fiind în mod evident importantă, deoarece influxul nervos reprezintă o degajare bruscă de energie (deci, disiparea unei părţi din energia liberă a nervului) ca răspuns la stimulul care l-a declanşat.

Studiul energeticii activităţii nervoase contribuie la precizarea mecanismelor moleculare ale acestei activităţi şi reprezintă interes practic de perspectivă din două puncte de vedere : a) pentru posibilitatea influenţării din exterior a funcţiei nervoase şi b) pentru conceperea de sisteme tehnice de prelucrare a informaţiei care să se apropie de eficienţa sistemului nervos.

În acest capitol vor fi analizate problemele energetice ale activităţii nervului, referindu-ne numai la acele procese care sînt direct implicate în excitabilitate, nu şi la aspectele trofice şi de neurosecreţie. Vom urmări modul în care energia metabolică serveşte la menţinerea potenţialului de repaus şi a compoziţiei ionice specifice a fibrelor ca premise necesare ale excitabilităţii şi procesele disipative de energie care au loc în timpul propagării excitaţiei.

Asemenea oricărei celule vii, neuronul în stare de repaus utilizează o parte din energia metabolică pentru menţinerea constantă a gradienţilor electrochimici ai Na^+ şi K^+ prin întreţinerea transportului activ al acestor ioni. Hurlbut (1958)

a stabilit că necesarul pentru acest scop este de ≈ 10% din energia eliberată prin metabolismul oxidativ sau ≈ 30% din cea eliberată prin metabolismul anaerob în nervul în repaus. Tot în starea de repaus, o altă parte a energiei metabolice, probabil cea mai importantă, este utilizată pentru sinteza constituenţilor celulari în pericarion şi pentru transportul lor de-a lungul axonului (Schmitt, 1969 ; Ochs, 1972).

În afara acestor utilizări în starea de repaus ale energiei metabolice, în timpul conducerii impulsurilor, o anumită cantitate de energie este necesară pentru propagarea excitaţiei de-a lungul fibrei nervoase şi pentru transmisia sinaptică a impulsurilor. O ilustrare citologică evidentă a acestor necesităţi energetice este faptul că mitocondriile („centralele energetice" celulare) sînt localizate lîngă membrana axonală (Geren şi Schmitt, 1954) şi sînt abundente în butonii sinaptici şi în dendrite.

IV.1. METABOLISMUL ENERGETIC AL NERVULUI

Studiile biochimice asupra nervului arată că metabolismul său este similar cu cel al altor ţesuturi. Substratul general utilizat în celulele nervoase este glucoza, în lipsa căreia potenţialele de acţiune evocate într-un nerv postganglionar de un stimul supramaximal aplicat pe nervul preganglionar scad progresiv pînă la dispariţie completă în aproximativ 2 ore (Larrabee, 1961). În acest timp sînt oxidate substraturi endogene şi conţinutul în ATP al preparatului este practic acelaşi ca şi în prezenţa glucozei. Faptul că energia rezultată din aceste oxidări nu menţine funcţia de conducere a influxului admite mai multe explicaţii plauzibile : a) metabolismul anormal din absenţa glucozei duce la produşi toxici ce distrug unele structuri esenţiale pentru conducerea impulsurilor ; b) unii produşi formaţi din glucoză, dar care nu pot fi formaţi din substraturile endogene ale nervului sînt esenţiali pentru funcţia sa normală.

În timpul activităţii creşte consumul de glucoză, cea mai mare parte a extraconsumului fiind oxidată pînă la CO_2. În concluzie, se poate afirma că glucoza este singurul substrat de bază oxidat de celulele nervoase atît în repaus, cît şi în activitate.

Glicoliza furnizează piruvat care este apoi metabolizat oxidativ pe calea ciclului lui Krebs. În condiţii de anoxie,

pe cale fermentativă este furnizată o cantitate de energie de numai ≈ 20% din valoarea normală, această cantitate fiind insuficientă pentru menţinerea excitabilităţii (Brink, 1957).

Inhibitorii metabolici care acţionează în diferite etape ale lanţului metabolic blochează excitabilitatea, inhibînd formarea de compuşi fosfatici macroergici (ATP şi creatinfosfat) necesari pentru transportul activ prin care se reface compoziţia ionică a axoplasmei. O modificare a rezervei de ATP pare a fi produsă, prin mecanisme insuficient cunoscute, şi de către apa deuterată (D_2O) (Vasilescu şi colab., 1976). Pierderea excitabilităţii prin anoxie, lipsă de glucoză sau datorită inhibitorilor metabolici nu este datorată unei legături directe între reacţiile metabolice şi potenţialul de membrană, ci se produce prin intermediul afectării distribuţiei ionice normale asimetrice (Shanes, 1958; Caldwell, 1958). Înţelegerea cuplajului dintre metabolismul oxidativ şi utilizarea energiei pentru propagarea impulsurilor nervoase este complicată de faptul că azida şi fluoroacetatul de sodiu inhibă extraconsumul de oxigen datorat activităţii, dar nu afectează consumul de oxigen de repaus (Doty şi Gerard, 1950). Capacitatea de a conduce impulsuri a fost neafectată pentru cel puţin 24 de ore într-un nerv tratat cu 0,1 mM azidă de sodiu, ca şi cum intensitatea oxidărilor de repaus ar fi suficientă pentru furnizarea ATP-ului consumat ca urmare a stimulării. Un rezultat similar a fost obţinut folosind cloretonă care reduce chiar şi respiraţia de repaus. Se pare deci că şi numai o parte din energia metabolică de repaus este suficientă pentru conducerea unei secvenţe de 1—2 milioane de impulsuri nervoase. O explicaţie posibilă poate fi aceea că resursele energetice interne furnizează suficientă energie pentru conducerea impulsurilor, dar că astfel fibra nervoasă acumulează totuşi treptat Na^+ şi pierde K^+, astfel reducîndu-şi excitabilitatea.

Deoarece o mare parte a cercetărilor de biofizica excitaţiei nervoase sînt făcute pe axoni giganţi perfuzaţi intern, din care s-a scos ≈ 95% din axoplasmă, este important de notat că în stratul subţire de axoplasmă rămasă în jurul membranei excitabile sînt totuşi mitocondrii care pot produce ATP atunci cînd un substrat adecvat (glutamat şi aspartat) este prezent în mediul de perfuzie. Martin şi Shaw (1970) au arătat că în axonii giganţi perfuzaţi intern are într-adevăr loc sinteza ATP de către un sistem enzimatic

ce reacţionează specific cu glutamat şi aspartat, stocîndu-se energie utilizabilă pentru desfăşurarea funcţiei de conducere a impulsurilor, dar acest sistem enzimatic nu este în mitocondrii, ci localizat direct pe suprafaţa internă a membranei excitabile. Alte cercetări (Baker şi colab., 1968; Foster şi colab., 1969) au demonstrat că, existînd în lichidul de perfuzie ATP ca sursă de energie, în axonii perfuzaţi continuă să se desfăşoare transportul activ de Na^+ şi K^+, astfel încît în ansamblu se poate afirma că aceşti axoni, deşi rămaşi aparent ca o simplă membrană, au toate premisele metabolice pentru desfăşurarea normală a funcţiei de conducere a impulsurilor.

IV.2. CONSUMUL DE OXIGEN ŞI PRODUCEREA DE CĂLDURĂ ÎN NERV

Avînd în vedere faptul că nervul obţine energia necesară desfăşurării funcţiei sale pe baza oxidării substraturilor (glucoza), este evident că activitatea sa metabolică poate fi urmărită măsurînd consumul de oxigen al fibrelor şi al centrilor nervoşi. Consumul de oxigen în repaus poate fi măsurat cu un respirometru manometric de tip Warburg, dar variaţiile consumului de oxigen în timpul stimulării sînt atît de mici, încît metoda Warburg este inaplicabilă şi trebuie folosită metoda mult mai sensibilă a catodului de oxigen (Davies, 1962).

Primele măsurători ale respiraţiei nervului în timpul activităţii sînt din perioada anilor 1930, dar măsurătorile de mare precizie au devenit posibile numai după construirea respirometrelor cu flux continuu, în care un catod de oxigen urmăreşte variaţia concentraţiei O_2 dizolvat în soluţia fiziologică ce scaldă nervul respectiv (Carlson şi colab., 1950), aşa cum este arătat în fig. IV.1.

În tabelul IV.1 sînt prezentate valorile consumului de oxigen al unor nervi şi centri nervoşi în stare de repaus. Aceste valori ilustrează ordinul de mărime al respiraţiei nervului şi arată că activitatea metabolică a centrilor nervoşi este mult mai intensă decît a fibrelor, centrii conţinînd corpii neuronali unde are loc sinteza constituenţilor celulari.

În cursul stimulării cu frecvenţă constantă a unui nerv, consumul său de oxigen creşte şi atinge o valoare staţionară în $\approx$ 30 minute, iar după oprirea stimulării revine încet la

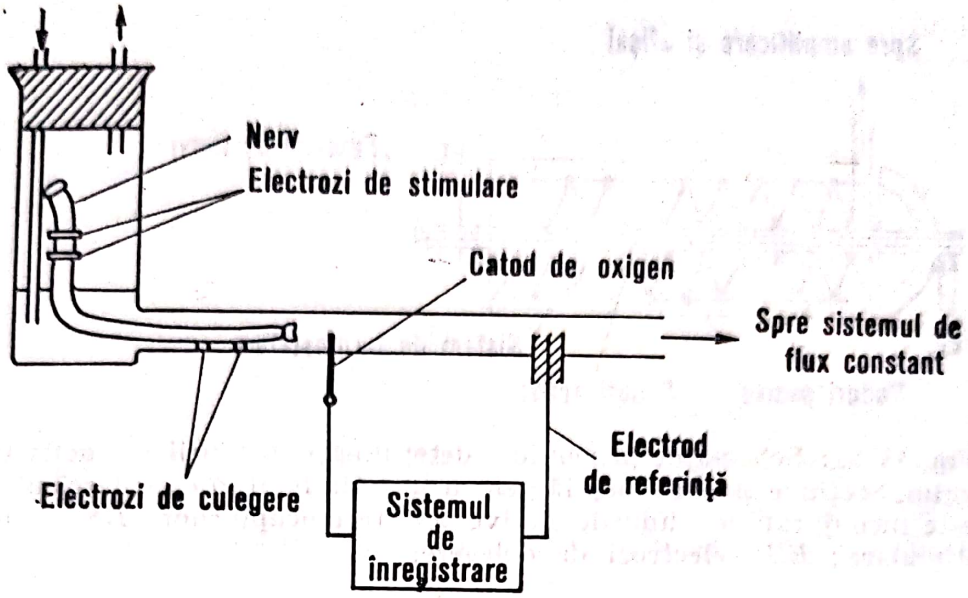


Fig. IV.1.: Schema simplificată a determinării consumului de oxigen al nervului cu ajutorul unui catod de oxigen, în cadrul unui respirometru cu flux continuu.

valoarea iniţială. Valoarea staţionară a consumului de oxigen (notat cu R_{O_2}) creşte cu frecvenţa de stimulare f, putînd fi exprimată în cazul nervului sciatic de broască de relaţia empirică:

$$R_{O_2} = 1{,}2[1 - \exp(-f/40)]\ \mu\text{mol/h}\cdot\text{g}$$

(Brink şi colab., 1952).

Dacă este raportat per impuls, extraconsumul de oxigen al nervului scade cu frecvenţa de stimulare de la 8 pmol O_2/g pentru o stimulare de 5 imp/s, pînă la 1,5 pmol O_2/g pentru o stimulare de 200 imp/s (Brink şi colab., 1952).

TABELUL IV.1.

Comparaţie între consumul de oxigen în nervi şi în centrii nervoşi
(date citate după Marx, 1970)

Materialul biologic	Condiţii	Consumul de oxigen (Q_{O_2}) μlO_2/hg (ţesut proaspăt)
Nerv sciatic de broască	24°C, iarna	65
Nerv sciatic de broască	22°C, primăvara	42–55
Nerv sciatic de broască	22°C, vara	56
Centri cerebrali de broască	24°C, iarna	390–475
Nerv sciatic de pisică	37°C	270
Centri cerebrali de pisică	37°C	2400
Axon gigant de sepie	21°C	160
Lobii optici de sepie	21°C	950

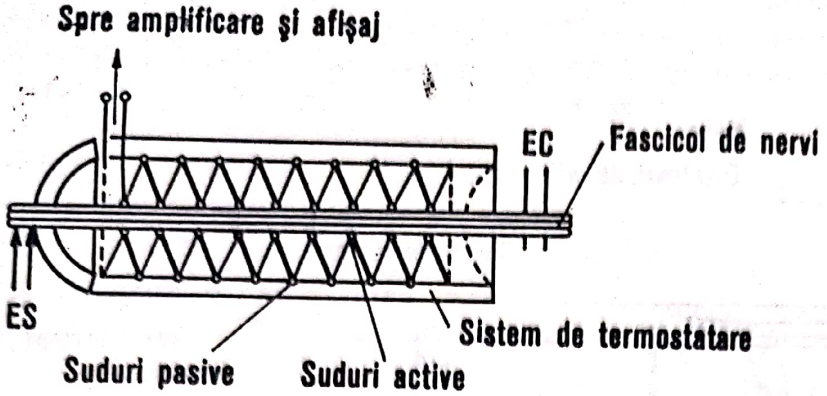


Fig. IV.2. : Schema de principiu a determinării căldurii de activitate a nervului. Secțiune prin termopilă pentru a arăta felul în care fasciculul de nervi este înconjurat de sudurile active ale termocuplurilor. *ES* — electrozi de stimulare ; *EC* —electrozi de culegere.

Concluziile acestor studii mai vechi au fost confirmate de cercetările din ultimii ani. Astfel, studiind consumul de oxigen al fibrelor nemielinizate din nervul vag de iepure, Ritchie (1967) a obținut următoarele rezultate : consumul mediu de oxigen în repaus este de $9{,}24 \cdot 10^{-8}$ mol O_2/g · min (la 21°C). Stimularea timp de 1—3 minute cu 3 imp/s determină un extraconsum per impuls de 816 pmol O_2/g, extraconsumul scăzînd cînd frecvența de stimulare crește. Un impuls solitar pare să producă un extraconsum de 1,2 nmol/g.

Ca rezultat al diferitelor procese în care este utilizată energia metabolică stocată în legăturile chimice, aceasta este degradată finalmente la căldură, pe care respectivul sistem biologic o degajă în exterior. Măsurarea degajării de căldură a fibrelor nervoase este o metodă directă de a urmări disiparea totală de energie asociată cu funcția lor*. În principiu, aceste determinări se fac plasînd nervul în interiorul unei incinte de dimensiunile lui, înconjurat de sudurile unui număr de cîteva sute de termocupluri înseriate. Acestea reprezintă sudurile „calde", cele „reci" fiind în exterior în contact cu un termostat. Ieșirea generală a termopilei (dînd $\approx$ $\approx 3 \cdot 10^{-3}$ V/°C) este conectată la dispozitivul de amplificare și afișaj. Schema de principiu a măsurătorilor microcalorimetrice de acest tip este reprezentată în fig. IV. 2.

În cercetările mai vechi, rezumate de Feng (1936), a putut fi măsurată căldura degajată de un nerv în repaus și

* Cercetările asupra căldurii degajate de nerv au fost inițiate de A. V. Hill în jurul anului 1920 și continuate împreună cu colaboratorii săi pînă în ultimii ani.

atunci cînd conduce un mare număr de impulsuri. În condiţii normale, un nerv de broască în repaus degajă $3 \cdot 10^{-3}$ cal/g · min, iar în absenţa oxigenului degajă numai 30% din valoarea normală, ceea ce arată că aceasta este fracţiunea din energia metabolică ce poate fi asigurată pe cale fermentativă. Excesul de căldură degajată de nerv atunci cînd este stimulat, numit căldură de activitate, constă din două componente: a) *căldura iniţială*, legată direct de propagarea impulsului nervos (apare brusc şi se menţine tot timpul stimulării iar apoi încetează odată cu aceasta); b) *căldura de restaurare*, legată de refacerea compoziţiei ionice a fibrelor (creşte progresiv pe măsura stimulării şi dispare lent după încetarea acesteia) (Hill, 1960). Căldura iniţială reprezintă numai ≈ 3% din căldura de activitate, restul fiind căldura de restaurare.

Căldura de activitate creşte cu creşterea frecvenţei de stimulare, într-un mod absolut paralel cu extraconsumul de oxigen discutat mai sus (fig. IV. 3).

Apariţia şi utilizarea unei aparaturi electronice de măsură cu inerţie mult mai mică au permis urmărirea schimburilor de căldură asociată cu un singur impuls. Acest lucru a fost mai întîi posibil pentru fibrele nemielinizate de crab şi homar (Abbott şi colab., 1958, 1965) şi de mamifere (Keynes şi Ritchie, 1965; Howarth şi colab., 1968). Avantajul utilizării fibrelor nemielinizate este că în cazul lor căldura iniţială este mult mai mare, iar căldura de restaurare apare cu o latenţă suficient de mare pentru a o putea separa de cea ini-

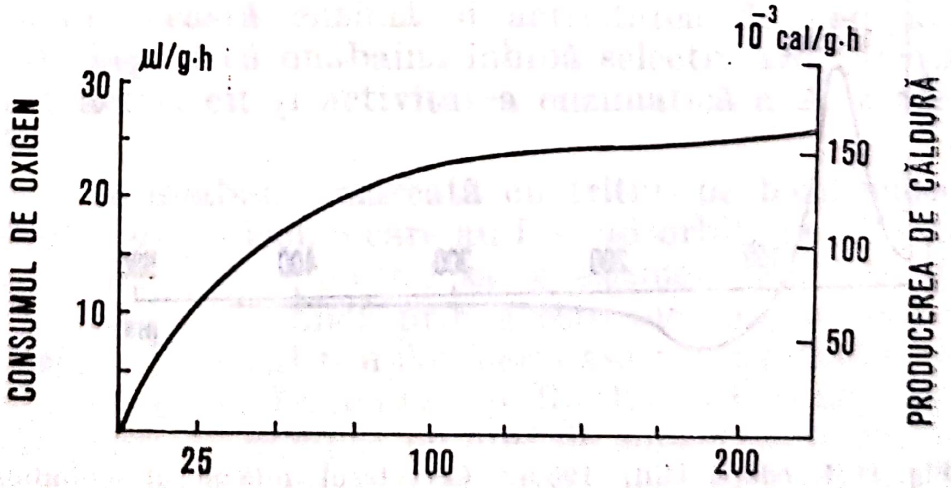


Fig. IV.3. (după Connelly, 1959): Variaţia cu frecvenţa de stimulare a consumului de oxigen şi a producerii de căldură în nervul de broască stimulat.

țială. Materialul cel mai adecvat pentru măsurarea efectelor termice asociate cu propagarea impulsurilor sînt nervii amielinizați cu fibre de diametru cît mai constant, așa cum sînt în nervul vag de iepure și în nervul olfactiv de știucă. Atunci cînd nervul de crab *Maia squinado* conduce un singur impuls, el degajă în 60 ms o cantitate de căldură de $8{,}8 \cdot 10^{-6}$ cal/g, iar în următoarele 300 ms reabsoarbe $6{,}8 \cdot 10^{-6}$ cal/g, așa încît căldura inițială netă de activitate este de $2 \cdot 10^{-6}$ cal/g · imp (fig. IV.4). Valorile căldurii degajate variază pentru diferiții nervi pe care s-a lucrat în domeniul $(1-10) \cdot 10^{-6}$ cal/g · imp, în toate cazurile fiind reabsorbită 80% din căldura degajată. S-a constatat un strîns paralelism între căldura eliberată și faza de creștere a potențialului de acțiune și între căldura reabsorbită și faza de scădere.

Au fost propuse mai multe explicații posibile ale efectelor termice asociate cu impulsul nervos, nici una nefiind încă satisfăcătoare. Teoria după care căldura eliberată reprezintă disiparea de energie electrică stocată în capacitatea membranei, iar căldura reabsorbită provine din reîncărcarea capacității, nu poate explica decît maximum 50% din valorile observate. Căldurile de amestec în cele două soluții (internă și externă) ale ionilor care traversează membrana în timpul potențialului de acțiune sînt mult prea mici pentru a explica valorile găsite experimental.

O ipoteză ce pare a cîștiga o fundamentare din ce în ce mai solidă din punct de vedere fizic este că o mare parte a

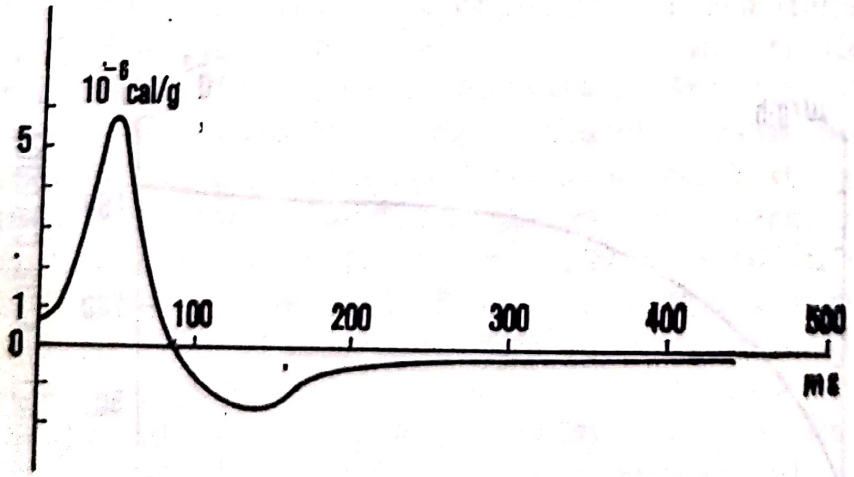


Fig. IV.4. (după Hill, 1960): Caracterul bifazic al schimburilor termice în nervul de crab în urma conducerii unui singur impuls. O degajare rapidă de căldură este urmată de reabsorbția lentă a aproximativ 80% din căldura degajată.

efectelor termice asociate cu impulsul nervos provin din modificări ale entropiei membranei nervului cînd este depolarizat şi repolarizat, în sensul că scăderea entropiei membranei în timpul depolarizării şi creşterea ei în timpul repolarizării duc — datorită ireversibilităţii proceselor — la o anumită disipare a energiei libere în căldură (Howarth şi colab., 1968; Howarth, 1974, 1975; Mărgineanu şi Schoffeniels, 1977).

IV.3. ENERGIA NECESARĂ TRANSPORTULUI ACTIV ÎN NERV

În prezent este unanim acceptat faptul că toate sistemele vii, şi în particular celulele, sînt *structuri disipative* (Prigogine, 1971) a căror menţinere nu este posibilă decît pe baza unei continue disipări de energie. O ilustrare a acestei disipări este utilizarea energiei metabolice pentru desfăşurarea fluxurilor active de ioni prin membrana celulară pentru menţinerea constantă a gradienţilor de potenţial electrochimic a căror rezultantă de ansamblu este potenţialul de repaus.

Atît menţinerea în stare de repaus a compoziţiei ionice a axoplasmei diferită de cea a fluidului extracelular, cît şi restabilirea ei după trecerea impulsurilor sînt realizate de aşa-numita pompă de sodiu şi potasiu care scoate afară Na^+ şi reintroduce K^+. Această pompă este o ATP-ază de transport activată de sodiu şi de potasiu (Skou, 1971), numită „ATP-aza de Na—K". O dovadă clară a legăturii directe dintre această enzimă şi activitatea de pompare a ionilor este faptul că ouabaina inhibă selectiv atît funcţia de transport activ, cît şi activitatea enzimatică a ATP-azei de Na—K.

Utilizîndu-se ouabaină marcată cu tritiu, pe baza măsurării numărului de molecule care au fost adsorbite pe diferite membrane celulare, este posibil să se estimeze numărul de locuri de pompare a ionilor prin aceste membrane (Baker şi Willis, 1969). În cazul fibrelor nervoase nemielinizate din nervul vag de iepure, Landowne şi Ritchie (1970) au găsit că sînt 750 locuri de pompaj pe μm^2 de suprafaţă membranară, ceea ce corelat cu intensitatea transportului arată că fiecare astfel de pompă ionică poate vehicula maximum 22 ioni de sodiu/s.

Este de remarcat că în aceleași fibre nemielinizate pe 1 μm^2 sînt 75 de canale prin care intră sodiul în citoplasmă în timpul excitației, deci locurile de pompare activă a sa în afara axoplasmei sînt de 10 ori mai numeroase. Această situație, existentă și în cazul altor nervi investigați (Balerna și colab., 1975), este de înțeles, dat fiind că intrarea sodiului sub influența gradientului electrochimic se face cu o intensitate mult mai mare ($\sim 10^{-8}$ ioni/s per canal) decît aceea pe care ar putea-o atinge transportul activ.

Intensitatea consumului de energie pentru funcționarea pompelor ionice poate fi dedusă calculîndu-se funcția de disipare Φ care definește în cadrul termodinamicii proceselor ireversibile (Katchalsky și Curran, 1965) puterea disipată într-un anumit ansamblu de procese și ale cărei valori pot fi aflate dacă se cunosc fluxurile din care constau respectivele procese și cauzele (forțele) care determină aceste fluxuri.

Pentru un sistem izoterm și izobar, așa cum este o fibră nervoasă plasată în lichidul interstițial, potențialul electrochimic molar al unor ioni de tip k a căror activitate proporțională cu concentrația este a_k și încărcarea electrică este z_k va avea expresia:

$$\bar{\mu}_k = \mu_k^0 + RT \ln a_k + z_k F\varphi, \qquad \text{(IV.1)}$$

unde μ_k^0 este potențialul chimic standard, R — constanta gazelor, T — temperatura, $F(= 96500\ \mathrm{C\ mol^{-1}})$ — numărul lui Faraday, iar φ este valoarea potențialului electric. Notînd axoplasma și lichidul interstițial respectiv cu indicii (i) și (e), potențialele electrochimice în cele două compartimente sînt:

$$\bar{\mu}_k^i = \mu^\circ + RT \ln a_k^i + z_k F\varphi^i$$

$$\bar{\mu}_k^e = \mu_k^0 + RT \ln a_k^e + z_k F\varphi^e.$$

Fluxurile ionice sînt definite ca variația numărului de moli n_k în unitatea de timp, toate valorile care vor fi introduse în calculele concrete fiind raportate la unitatea de masă de țesut:

$$J_k \equiv \frac{dn_k}{dt}, \text{ deci } J_k^i = \frac{dn_k^i}{dt} \text{ și } J_k^e = \frac{dn_k^e}{dt}. \qquad \text{(IV.2)}$$

Conservarea masei pentru fiecare tip de ion în întregul sistem : $\frac{d(n_k^i + n_k^e)}{dt} = 0$,

implică pe baza definiţiei de mai sus :

$$J_k^i = -J_k^e. \qquad \text{(IV.3)}$$

Ecuaţia lui Gibbs, care reuneşte principiile I şi II ale termodinamicii, exprimă variaţia totală de entropie în sistem, dS, ca o sumă între entropia asociată cu schimbul de căldură, dQ/T şi producerea de entropie datorită fluxurilor din sistem care sînt procese ireversibile prin care o parte din energia liberă este disipată sub formă de căldură :

$$dS = \frac{dQ}{T} + \sum_k \left[\frac{\overline{\mu_k^e}}{T} dn_k^e + \frac{\overline{\mu_k^i}}{T} dn_k^i \right]. \qquad \text{(IV.4)}$$

Pe baza relaţiilor (2) şi (3) de definire a fluxurilor ionice, ecuaţia lui Gibbs poate fi scrisă sub forma :

$$dS = \frac{dQ}{T} + \sum_k \frac{\overline{\mu_k^i} - \overline{\mu_k^e}}{T} J_k^i \, dt. \qquad \text{(IV.5)}$$

Diferenţele de potenţial electrochimic sînt :

$$\overline{\mu}_k^i - \overline{\mu}_k^e = RT \ln \frac{a_k^i}{a_k^e} + z_k F(\varphi^i - \varphi^e),$$

în această relaţie apărînd diferenţa de potenţial electric transmembranar $\varphi^i - \varphi^e \equiv E$ pe care o dau măsurătorile cu microelectrozi şi potenţialele de echilibru electrochimic E_k, definite prin relaţia lui Nernst :

$$RT \ln \frac{a_k^i}{a_k^e} \equiv z_k F E_k.$$

Cu acestea, relaţia (5) devine :

$$dS = \frac{dQ}{T} + \sum_k z_k F \frac{E - E_k}{T} J_k^i dt,$$

în care în mod evident suma dă producerea internă de entropie datorită fluxurilor ionice:

$$d_iS = \sum_k z_k F \frac{E - E_k}{T} J_k^i dt.$$

Deoarece prin definiție funcția de disipare este: $\Phi \equiv \equiv T \frac{d_iS}{dt}$, rezultă:

$$\Phi = \sum_k z_k F(E - E_k) J_k^i. \qquad \text{(IV.6)}$$

Toate mărimile care apar în expresia de mai sus a disipării de energie în sistem sînt accesibile din punct de vedere experimental, deoarece, în afara potențialului transmembranar menționat anterior, potențialele de echilibru electrochimic E_k sînt determinate măsurînd activitățile interne și externe ale ionilor cu electrozi selectivi, iar fluxurile ionice J_k sînt măsurate cu radioizotopi. Folosind datele lui Hurlbut (1958) pentru nervul sciatic de broască și cele ale lui Hodgkin și Keynes (1955) pentru axonul gigant de calmar, se obțin următoarele valori pentru disiparea de energie datorită fluxurilor ionice (Mărgineanu, 1970; 1977):

$18{,}3 \times 10^{-6}$ J.s^{-1}g^{-1} în nervul sciatic de broască;

$10{,}1 \times 10^{-5}$ J.s^{-1}g^{-1} în axonul gigant de calmar.

Semnificația fiziologică a acestor calcule rezultă din comparația cu disiparea totală de energie în nervi. Consumul de oxigen al nervului sciatic de broască ($\approx 6 \times 10^{-4}$ cm^{3}O$_2$ min^{-1}g^{-1}) corespunde unei eliberări totale de energie de 2×10^{-4} Js^{-1}g^{-1}, ceea ce înseamnă că fluxurile de sodiu și potasiu utilizează aproximativ 9% din totalul energiei obținute de nerv prin respirația celulară. Consumul de oxigen al axonului gigant este $26{,}6 \times 10^{-4}$ cm^{3}O$_2$min^{-1}g^{-1} (Cardot, Faure și Arvanitaki, 1950), corespunzînd cu 9×10^{-4}J·s^{-1}·g^{-1}, deci fluxurile ionice disipează ≈ 11% din energia metabolică. Presupunînd că sistemul de pompare activă a ionilor (ATP-aza de transport) utilizează energia furnizată de metabolismul oxidativ cu o eficiență în jur de 50%, rezultă că în ambele tipuri de nerv analizate mai sus aproximativ 20% din energia metabolismului oxidativ este suficientă pentru funcționarea pompei de sodiu și potasiu.

O dovadă experimentală foarte clară în sprijinul acestor concluzii este faptul că ouabaina inhibă aproximativ 20% din intensitatea consumului de oxigen în stare de repaus în diferiţi nervi (Raug şi Ritchie, 1968; Brink, 1975), deci inhibarea selectivă a transportului activ de ioni determină scăderea producerii de energie metabolică exact în proporţia care a fost calculată ca reprezentînd ponderea transportului în ansamblul energeticii celulare.

În timpul potenţialului de acţiune, membrana axonală, devenind mai permeabilă, este traversată de fluxuri ionice ample: un flux de sodiu din exterior spre axoplasmă şi un flux aproximativ egal de potasiu în sens invers; afară de acestea, mai sînt şi fluxurile mult mai mici de Cl^- şi Ca^{2+} care constituie curenţii electrici „de scurgeri" (§ III.3.2). Ca urmare a propagării potenţialelor de acţiune, axoplasma acumulează sodiu şi pierde potasiu, pentru refacerea compoziţiei ei fiind necesară intensificarea pompării de ioni.

Dacă în formula (6) care dă funcţia de disipare sînt introduse valorile fluxurilor ionice din cursul potenţialului de acţiune iar apoi se integrează pe durata de timp a acestei variaţii de potenţial se obţin următoarele valori pentru disiparea totală de energie asociată cu fluxurile de ioni (Mărgineanu, 1972 a; 1977):

5×10^{-8} J cm^{-2}/impuls pentru axonul gigant de calmar;
6×10^{-7} J cm^{-2}/impuls pentru membrana nodului Ranvier din nervul sciatic de *Xenopus laevis*.

Valoarea de 12 × mai mare din cazul membranei nodului Ranvier comparativ cu aceea pentru membrana axonului gigant provine din densitatea mult mai mare a curenţilor ionici care traversează membrana nodală.

O energie egală cu aceea disipată de fluxurile pasive ce traversează membrana în timpul impulsului (valorile de mai sus) este stocată atunci cînd transportul activ restabileşte gradienţii ionici. Intensitatea crescută a activităţii de pompare a ionilor se reflectă în creşterea consumului de energie şi a producerii de căldură, aceasta fiind căldura de restaurare. Aşa cum este de aşteptat, blocarea cu ouabaină a transportului activ anulează complet extraconsumul de oxigen datorat stimulării (Rang şi Ritchie, 1968).

IV.4. PROCESE DISIPATIVE DE ENERGIE ÎN NERV ÎN TIMPUL POTENŢIALULUI DE ACŢIUNE

Propagarea influxului nervos este asociată în mod direct şi imediat numai cu acea parte din căldura de activitate numită *căldură iniţială*, care apare şi încetează imediat odată cu stimularea. Pînă în prezent, valorile determinate experimental ale căldurii iniţiale de activitate nu au putut fi explicate satisfăcător prin nici una din ipotezele bazate exclusiv pe teoria ionică a excitaţiei. Toate aceste tentative se referă, sub diferite nume ca: teoria condensatorului, căldura curenţilor locali, interschimbul ionic, numai la energia asociată cu fluxurile de ioni din timpul influxului nervos, iar energetica proceselor moleculare ce au loc în însăşi membrana excitabilă a fost practic neglijată.

Wei (1972, 1974), pe baza teoriei dipolare a influxului nervos, a atribuit producerea şi absorbţia de căldură în nerv tranziţiilor (*flip-flop*) a dipolilor membranari. Aceasta revine la a asocia toată energetica influxului nervos exclusiv cu deplasările intramembranare de sarcină electrică, deci cu aşa-numiţii curenţi „de poartă" (§ III.4.3). Concordanţa calculelor sale cu datele experimentale se bazează numai pe alegerea destul de arbitrară a distribuţiei dipolilor. Recent, Coster (1975) şi Hill (1975) au luat în considerare efectele electromecanice (electrostricţiunea) care ar avea loc în membrana axonală sub influenţa variaţiilor de cîmp electric din timpul excitaţiei. Referitor la aceasta, trebuie observat faptul că toate abordările în care membrana este considerată drept un mediu continuu, nu ţin seama de diversitatea şi neuniformităţile la nivel molecular ale acesteia (II.1).

Orice analiză a căldurii iniţiale de activitate trebuie să ia în considerare contribuţiile tuturor proceselor ce au loc în fibra nervoasă în timpul potenţialului de acţiune. Principalele procese apar a fi: 1) fluxurile ionice pasive de sodiu şi potasiu prin respectivele canale ionice;

2) redistribuirile intramembranare de sarcină electrică, ce constau atît din redistribuirea electronilor pe moleculele lipidice care formează dielectricul capacităţii membranare, cît şi deplasările părţilor încărcate ale canalelor (curenţii „de poartă");

3) modificările structurale ale canalelor induse de variaţiile de cîmp electric.

Aceste procese pot fi în mod tentativ corelate cu constituenţii membranari observînd că 1) exprimă modificările din compartimentele ionice şi interacţia ionilor cu membrana; 2) se referă în principal (dar nu exclusiv) la lipidele membranare, iar 3) sînt asociate cu proteinele funcţionale din membrană. În afara acestor trei tipuri de procese, mai este un schimb reversibil al Ca^{2+} din membrană cu K^+ din axoplasmă (Tasaki, 1968), dar a cărui contribuţie la căldura de activitate este mai puţin semnificativă.

IV.4.1. Disiparea de energie datorită fluxurilor ionice din timpul PA

Deducerea făcută în paragraful 3 pentru funcţia de disipare sugerează imediat că extradisiparea de energie în raport cu starea de repaus datorită fluxurilor ionice crescute din timpul PA este:

$$\Phi_I = \sum_i [J_i \Delta\bar{\mu}_i - (J_i \Delta\bar{\mu}_i)_r],$$

unde indicele (i) se referă la diferitele tipuri de ioni, (r) desemnează starea de repaus, cu J_i sînt notate fluxurile ionice, iar $\Delta\bar{\mu}_i = z_i F(V - V_i)$ sînt gradienţii de potenţial electrochimic. Simbolul V, utilizat acum în loc de E, reprezintă valorile potenţialului de membrană normalizate astfel încît în starea de repaus, în loc de -60 mV să fie aproximativ zero. Pentru axonul gigant de calmar, în mod exact $V_r = 0{,}01$ mV. Deci: $V = E + 60$ mV; $V_i = E_i + 60$ mV şi $V - V_i = E - E_i$.

Prin definiţie: $z_i F J_i = I_i = g_i(V - V_i)$, cu g_i fiind notate conductanţele parţiale ale membranei pentru fiecare tip de ioni, astfel încît:

$$\Phi_I(t) = \sum_i \{g_i(t)[V(t) - V_i]^2 - g_{ir}[V_r - V_i]^2\}.$$

Toate cantităţile care apar în această relaţie pot fi obţinute fie din datele de analiză a curenţilor ionici prin membrana axonului gigant în timpul potenţialului de acţiune (Hodgkin şi Huxley, 1952), fie din simulările matematice ale acestor curenţi. Calculele de mai jos se bazează pe valorile

obținute de Dubois și Schoffeniels (1974) din simularea pe calculator a ecuațiilor cinetice ale modelului lor, în cadrul căruia au putut reproduce cu mare acurateţe variația în timp a potenţialului de membrană $V(t)$ și a conductanţelor parţiale $g_i(t)$. Calculînd pe baza acestor date valorile Φ_I se obţin rezultatele reprezentate în fig. IV.5.

Disiparea totală de energie de către curenţii ionici din timpul PA este integrala valorilor $\Phi_I(t)$ pe durata PA. Aceasta are valoarea de $49{,}64 \times 10^{-9}$ J·cm^{-2}, ceea ce, pentru o suprafaţă specifică de 80 cm^2/g, dă o producere de căldură de 0,95 μcal·g^{-1}/impuls.

Eliberarea calciului de pe locurile specifice de adsorbţie din membrană în timpul depolarizării și readsorbția sa în timpul repolarizării duc, în mod foarte probabil, la o degajare urmată de o reabsorbţie de căldură, aşa cum a propus Tasaki (1968). Dacă se ia valoarea citată de Tasaki, de 2,7 kcal mol^{-1} pentru căldura de interschimb Ca^{2+} — K^+ și influxul de Ca^{2+} de 0,006 pmol·cm^{-2}/impuls (Hodgkin și Keynes, 1957), în axonul gigant de calmar cu diametrul de 500 μm se obţine o căldură de numai $1{,}3 \times 10^{-2}$ μcal g^{-1}. Aceasta este cu două ordine de mărime inferioară faţă de căldura asociată cu fluxurile de sodiu și potasiu ce traversează membrana în timpul PA.

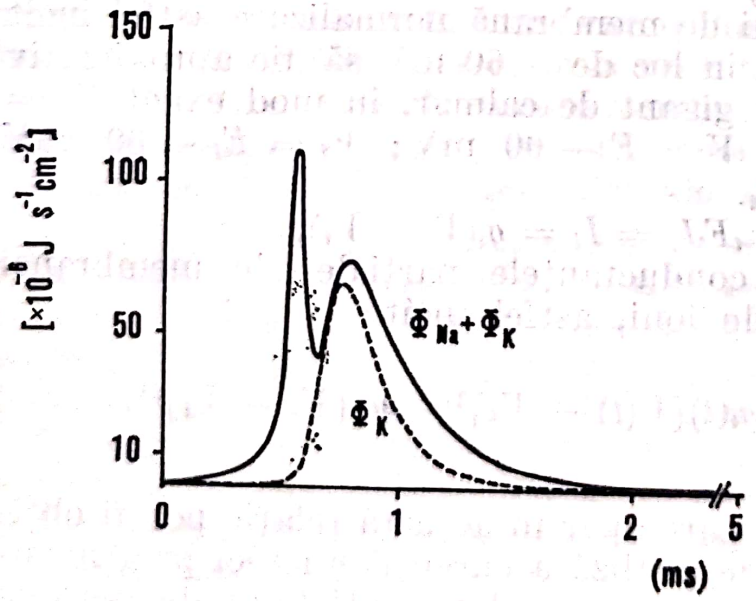


Fig. IV.5.: Valorile disipării de energie datorită fluxului de potasiu (Φ_K) și fluxurilor de sodiu și potasiu împreună, în timpul potenţialului de acţiune în axonul gigant.

IV.4.2. Disiparea de energie prin redistribuirile intramembranare de sarcină electrică

Modificările de încărcare electrică pe cele două fețe ale axolemei în timpul PA duc la o disipare de energie, Φ_C, care este produsul dintre potențialul transmembranar și curentul electric datorat acestor redistribuiri de sarcină, adică așa-numitul curent capacitiv I_C. Întrucît prin definiție : $I_C = C \frac{\partial E}{\partial t}$, unde C este capacitatea membranei, rezultă că :

$$\Phi_C = - CE\left(\frac{\partial E}{\partial t}\right) = - C(V-60)\frac{\partial V}{\partial t}.$$

Semnul (—) exprimă faptul că o scădere a potențialului transmembranar corespunde unei degajări de căldură (căldură pozitivă). Valorile calculate pentru Φ_C sînt reprezentate în fig. IV.6.

Deoarece după trecerea impulsului potențialul de membrană revine la valoarea sa de repaus, integrala Φ_C pe întreaga durată a PA este zero, dar ea constă dintr-o degajare de căldură de $4{,}12 \times 10^{-2}$ $\mu cal \cdot g^{-1}$ în prima milisecundă, urmată de reabsorbția mai lentă a unei cantități egale de căldură. Se poate observa că schimburile de căldură capacitivă sînt cu un ordin de mărime mai mici decît disiparea ionică de căldură care este întotdeauna pozitivă. Datorită

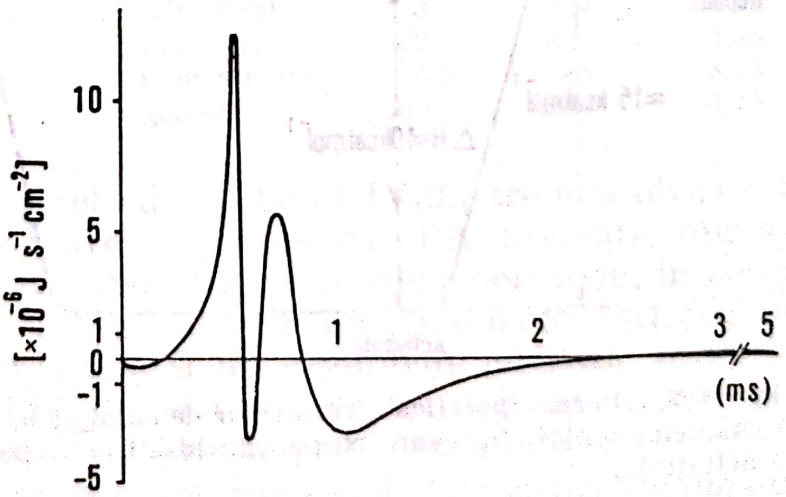


Fig. IV.6. : Variațiile de energie asociate cu încărcarea și descărcarea capacitorului membranei axonului gigant în timpul unui potențial de acțiune.

acestui fapt, considerarea numai a acestor două tipuri de fenomene nu va putea să explice caracterul bifazic al căldurii iniţiale de activitate.

IV.4.3. Modificările energetice asociate cu ciclul de permeabilitate al membranei excitabile

Luarea în considerare a aspectelor moleculare ale impulsului nervos, chiar dacă acestea sînt încă foarte puţin elucidate, sugerează drept o cauză foarte posibilă a variaţiei reversibile de căldură tranziţiile structurale din membrană. Alături de căldurile ionică şi capacitivă, este natural să se considere şi o *căldură membranară* care să exprime variaţiile de entalpie* asociate cu tranziţiile conformaţionale ale canalelor pentru sodiu şi potasiu. Aceste canale sau ionofori sînt proteine funcţionale care constau din subunităţi numite protomeri. Fiecare protomer trece în timpul tranziţiei conformaţionale peste o barieră de energie al cărei profil detaliat nu poate fi încă precizat, dar care poate fi evaluată pe baza unor date indirecte.

Starea de repaus a fiecărui protomer trebuie să corespundă unui nivel energetic superior faţă de starea de acti-

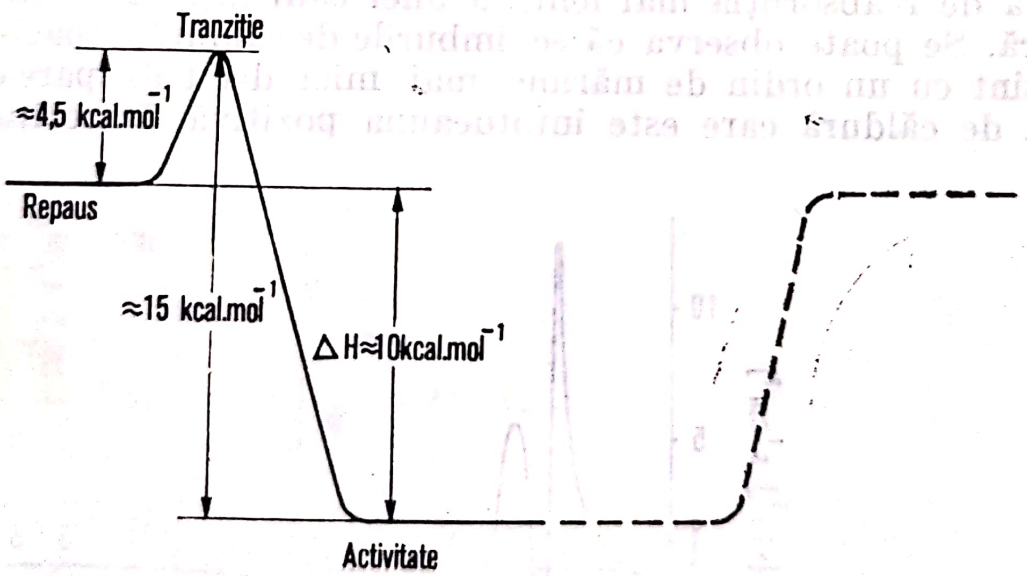


Fig. IV.7. : Forma ipotetică a variaţiilor de entalpie la trecerea unui protomer al canalelor ionice din conformaţia „închisă" de repaus în aceea „deschisă" de activitate.

---

* Entalpia este variaţia de căldură într-un sistem în condiţii izobare.

vitate, deoarece odată cu tranziţia de la conformaţia cu permeabilitate mică la cea cu permeabilitate mare a canalelor are loc o degajare de căldură. Faptul că nu se produce tranziţia în mod spontan — ceea ce ar implica autoexcitarea axonului — sugerează în mod clar că trebuie atinsă o stare energetică superioară, corespunzînd unui complex activat. Bariera energetică este deci de tipul reprezentat în fig. IV.7.

Propagarea excitaţiei de-a lungul axonului implică în primă instanţă tranziţia canalelor sodiului în conformaţia cu permeabilitate mare, aşa încît viteza acestei tranziţii este proporţională cu viteza de conducere a impulsului nervos. O analiză de tip Arrhenius a dependenţei de temperatură a vitezei de conducere poate deci indica entalpia de activare a trecerii canalelor din starea de repaus în aceea de tranziţie, de la care trec spontan în starea de activitate. Valorile acestei entalpii de activare pentru diferite fibre nervoase sînt redate în tabelul IV.2, împreună cu diametrele fibrelor şi vitezele lor de conducere la 20°C.

TABELUL IV.2.

Entalpia de activare a propagării influxului nervos în diferiţi axoni
(Mărgineanu, 1972 b)

Animalul	Nervul	Tipul de fibră	Diametrul (μm)	Viteza de conducere (ms^{-1})	Entalpia de activare (kcal. mol^{-1})
Xenopus laevis	sciatic	mielinizat	3	5,4	4,99
X. laevis	sciatic	mielinizat	22	39,6	4,85
Pisică	safen	nemielinizat	0,5	0,5	8,55
Calmar	axon	gigant	500	50	4,45

În legătură cu datele din tabelul IV.2., trebuie observat că entalpia de activare a propagării PA prezintă numai variaţii mici între diferitele tipuri de fibre nervoase, în timp ce atît diametrele, cît şi vitezele de conducere sînt foarte diferite. Acest fapt poate fi un argument puternic în sprijinul ideii că la nivel molecular este un mecanism unic de funcţionare a tuturor membranelor excitabile.

Diferenţa energetică dintre nivelul de tranziţie (complexul activat) şi conformaţia „deschisă" a protomerilor poate fi obţinută aplicînd teoria complexului activat la cinetica mo-

dificărilor de conductanță ale membranei axonale în timpul PA. Tsien și Noble (1969) și Levitan și Palti (1975) au obținut valori în jur de 15 kcal · mol^{-1}, așa încît variația netă de entalpie la trecerea canalelor sodiului din conformația de repaus în aceea de activitate este $\Delta H \approx 10$ kcal · mol^{-1}. Rezultă deci că fiecare protomer va elibera și apoi va reabsorbi o cantitate de energie:

$$q = \frac{\Delta H}{N_A} = 1{,}66 \times 10^{-20} \text{ cal} = 6{,}95 \times 10^{-20} \text{J},$$

(N_A fiind numărul lui Avogadro).

În acord cu majoritatea cercetărilor de biologie moleculară a membranelor excitabile (Dubois și Schoffeniels, 1974; De Robertis, 1971), putem considera că fiecare canal de sodiu și de potasiu este alcătuit din cîte 4 protomeri. Variația de energie în unitatea de timp datorită tranzițiilor acestor canale va fi deci:

$$\Phi_M = 4q\left(\frac{\partial n_{Na}}{\partial t} + \frac{\partial n_K}{\partial t}\right),$$

unde $\frac{\partial n_{Na}}{\partial t}$ și $\frac{\partial n_K}{\partial t}$ sînt numărul de canale de sodiu și respectiv de potasiu care suferă tranziția în unitatea de timp.

Deoarece în orice moment conductanțele ionice ale membranei sînt proporționale cu numărul de canale deschise, rezultă că:

$$\frac{\partial n_{Na}}{\partial t} = \frac{N_{Na}}{G_{Na}} \times \frac{\partial g_{Na}}{\partial t},$$

N_{Na} fiind numărul total de canale pentru sodiu pe unitatea de suprafață membranară, iar G_{Na}—valoarea maximă a conductanței pentru sodiu atinsă în timpul PA. O relație absolut analoagă este și pentru canalele potasiului.

Pînă în prezent nu există determinări directe ale numărului de canale pentru potasiu, în mod uzual considerîndu-se că este de același ordin de mărime cu numărul de canale pentru sodiu. Vom lua deci $N_K \approx N_{Na} = 483/\mu m^2$ pentru axonul gigant de calmar (Keynes și Rojas, 1974). Cu aceste

valori şi cu cele pentru G_{Na} şi G_K obţinute de Dubois şi Schoffeniels (1974) putem calcula schimburile de energie datorită tranziţiilor din membrane, obţinînd valorile reprezentate în fig. IV.8.

Integrînd aceste valori pe durata unui PA, se găseşte că în prima milisecundă se degajă 0,026 $\mu J \cdot cm^{-2}$, adică 0,5 $\mu cal \cdot g^{-1}$, urmată de reabsorbţia unei cantităţi egale de căldură în următoarele 2 milisecunde.

Calculele de mai sus oferă un tablou complet al schimburilor de energie din timpul PA în axonul gigant. Este, desigur, posibil să mai fie şi alte procese, dar, pe baza datelor actuale, principalele contribuţii sînt cele la care ne-am referit. Schimbul total de căldură asociat cu propagarea unui impuls este reprezentat în fig. IV.9. ca suma dintre Φ_I, Φ_C şi Φ_M.

Din această figură se poate înţelege faptul că rapiditatea şi valorile foarte mici ale schimburilor termice au făcut pînă în prezent imposibile măsurătorile calorimetrice în cazul axonului gigant. Astfel de măsurători există numai pentru fibrele mai mici din nervul de crab (*Maia squinado*), pentru nervul vag de iepure şi nervul olfactiv de ştiucă. În cazul acestor nervi, contribuţiile căldurii capacitive şi ale celei membranare devin dominante, iar acestea au, aşa cum s-a văzut, un caracter bifazic constînd din emisie şi reabsorbţie

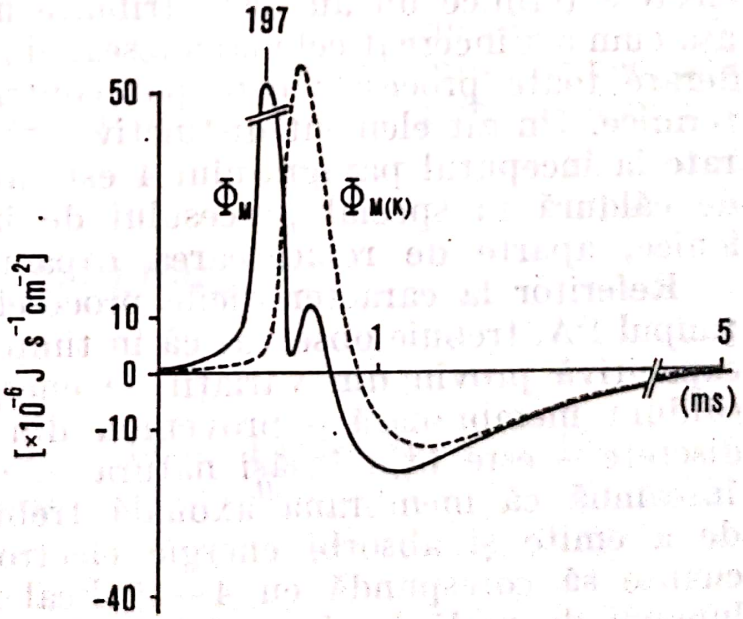


Fig. IV.8. : Variaţiile de energie calculate pentru tranziţiile canalelor potasiului ($\Phi_{M(K)}$) şi ale sodiului şi potasiului în ansamblu (Φ_M) în cursul unui potenţial de acţiune în axonul gigant.

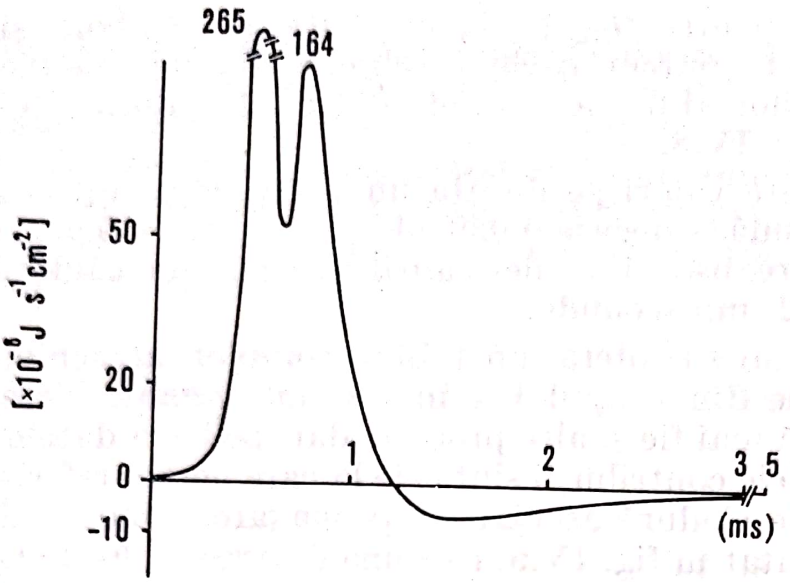


Fig. IV.9. : Valorile calculate pentru schimbul total de energie în timpul unui potențial de acțiune în axonul gigant.

de căldură. Ținînd seama de numărul de canale ionice și de suprafața membranară a unității de masă în cazul altor nervi, s-au putut estima valorile căldurii degajate și reabsorbite, obținîndu-se o bună concordanță cu datele experimentale (Mărgineanu și Schoffeniels, 1977).

Principala caracteristică a analizei făcute mai sus pentru schimburile energetice asociate cu propagarea PA este că efectele termice nu au fost atribuite unui singur fenomen, așa cum s-a încercat cel mai adesea, ci au fost luate în considerare toate procesele care pot contribui la aceste efecte termice. Un alt element distinctiv față de ipotezele enumerate la începutul paragrafului 4 este atribuirea reabsorbției de căldură în special procesului de închidere a canalelor ionice, aparte de reîncărcarea capacității membranare.

Referitor la caracteristicile proceselor care se produc în timpul PA, trebuie observat că în timp ce căldurile ionică și capacitivă provin din variații de energie de tip continuu, căldura membranară — provenind din tranziții între stări discrete — este prin însăși natura sa cuantificată. Aceasta înseamnă că membrana axonală trebuie să fie capabilă de a emite și absorbi energie electromagnetică ale cărei cuante să corespundă cu 4—15 kcal·mol^{-1}, deci să aibă lungimi de undă în domeniul 2—7 μm. Aceste valori sînt exact în infraroșul îndepărtat unde au fost detectate emisia (Fraser și Frey, 1968) și deplasările în spectrul de absorbție

(Sherebrin şi colab., 1972) ale nervilor stimulaţi. Aceasta nu pare a fi o simplă coincidenţă, deoarece domeniul spectral corespunde cu tranziţiile vibro-rotaţionale ale proteinelor, ceea ce concordă cu ipoteza tranziţiilor de conformaţie ale protomerilor din care sînt alcătuite canalele ionice.

Pe baza imaginii schiţate anterior pentru energetica potenţialului de acţiune, apare în principiu posibilă o „disecţie farmacologică" a căldurii iniţiale de activitate. Astfel, este de aşteptat ca tetrodotoxina (care blochează fluxurile de sodiu) să elimine contribuţia sodiului la disiparea ionică de energie, aşa încît în fig. IV. 5. va rămîne numai curba punctată; similar, un agent care ar bloca tranziţia canalelor sodiului va înlocui în fig. IV. 8. curba plină cu cea punctată, modificînd în mod corespunzător şi disiparea totală de energie.

* * *

Referitor la problemele energetice ale funcţionării nervului, sînt de reţinut următoarele concluzii generale. Metabolismul oxidativ furnizează energia metabolică necesară desfăşurării transportului activ prin care sînt menţinuţi gradienţii de potenţial electrochimic ai diferiţilor ioni între axoplasmă şi fluidul extracelular. Aceşti gradienţi constituie o înmagazinare de energie liberă care, în timpul excitaţiei, este parţial disipată de fluxurile ionice care traversează membrana axonală devenită mult mai permeabilă. Pentru restabilirea gradienţilor electrochimici este ulterior necesară intensificarea transportului activ şi deci a metabolismului oxidativ.

BIBLIOGRAFIE

A. Referinţe generale

Abbott, B. C., Howarth, J. V. (1973), „Physiol. Rev.", *53*, 120.
Ritchie, J. M. (1973), „Progr. Biophys. Molec. Biol.", *26*, 147.

B. Referinţe speciale

Baker, P. F., Willis, J. S. (1969), „Biochim. Biophys. Acta", *183*, 646.
Baker, P. F., Foster, R. F., Gilbert, D. S., Shaw, T. I. (1968), „Biochim. Biophys. Acta", *163*, 560.

BALERNA, M., FOSSET, M., CHICHEPORTICHE, R., ROMEY, G., LAZDUNSKI, M. (1975), „Biochemistry", *14*, 5500.

BRINK, F., JR. (1957), În *Metabolism of the Nervous System*, D. RICHTER (ed.), Pergamon Press, New York.

BRINK, F., JR. (1975), „Proc. Nat. Acad. Sci. USA", *72*, 3988.

BRINK, F., JR., BRONK, D. W., CARLSON, F. D., CONNELLY, C. M. (1952), „Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.", *17*, 53.

CALDWELL, P. (1968), „Physiol. Rev.", *48*, 1.

CARDOT, H., FAURE, S., ARVANITAKI, A. (1950), „J. Physiol." (Paris), *42*, 849.

CARLSON, F. D., BRINK, F. Jr., BRONK, D. W. (1950), „Rev. Sci. Instrum.", *21*, 923.

CONNELLY, C. M. (1959), În *Biophysical Science — A Study Program*, J. L. ONCLEY (ed. șef), Wiley, New York.

COSTER, H. G. L. (1975), „J. theor. Biol.", *54*, 225.

DAVIES, PH. W. (1962), În *Physical Techniques in Biological Research*, vol. IV, W. L. NASTUK (ed.), Academic Press, New York.

DE ROBERTIS, E. (1971), „Science", *171*, 963.

DOTY, R. W., GERARD, R. W. (1950), „Am. J. Physiol.", *162*, 458.

DUBOIS, D. M., SCHOFFENIELS, E. (1974), „Proc. Nat. Acad. Sci. USA", *72*, 2858.

FENG, T. P. (1936), „Ergebn. Physiol.", *38*, 73.

FOSTER, R. F., GILBERT, D. S., SHAW, T. I. (1969), „Biochim. Biophys. Acta", *183*, 401.

FRASER, A. H., FREY, A. (1968), „Biophys. J.", *8*, 731.

GEREN, B. B., SCHMITT, F. O. (1954), „Proc. Nat. Acad. Sci. USA", *40*, 863.

HILL, A. V. (1960), În *Molecular Biology*, D. Nachmansohn (ed.), Academic Press, New York.

HILL, M. W. (1975), „Phil. Trans. R. Soc. Lond.", *B 270*, 431.

HODGKIN, A. L., HUXLEY, A. F. (1952), „J. Physiol.", *117*, 500.

HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D. (1955), „J. Physiol.", *128*, 28.

HODGKIN, A. L., KEYNES, R. D. (1957), „J. Physiol.", *138*, 253.

HOWARTH, J. V. (1974), „Actualités neurophysiologiques", *10*, 31.

HOWARTH, J. V. (1975), „Phil. Trans. Roy. Soc. London", *B 270*, 425.

HOWARTH, J. V., KEYNES, R. D., RITCHIE, J. M. (1968), „J. Physiol.", *194*, 745.

HURLBUT, W. P. (1958), „J. gen. Physiol.", *41*, 959.

KATCHALSKY, A., CURRAN, P. F. (1965), *Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysics*, p. 80, Harvard Univ. Press, Cambridge Mass.

KEYNES, R. D., ROJAS, E. (1974), „J. Physiol.", *239*, 393.

LARRABEE, M. G. (1961), În *Biophysics of Physiological and Pharmacological Actions*, A. M. SHANES (ed.), Am. Assoc. Adv. Sci., Washington D.C.

LANDOWNE, D., RITCHIE, J. M. (1970), „J. Physiol.", *207*, 529.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL V

TRANSMISIA SINAPTICĂ

Rolul sistemului nervos de a vehicula în mod direcţionat între diferitele teritorii ale unui organism informaţia necesară funcţionării coordonate a acestuia impune transmiterea semnalelor (impulsurile nervoase) nu numai la mare distanţă, ci şi de la o celulă la alta. Joncţiunile dintre neuroni, ca şi ale neuronilor cu celulele efectoare (musculare şi glandulare) se fac prin nişte formaţiuni celulare complexe, specializate pentru rolul de „valve" care să regleze circulaţia semnalelor. Toate joncţiunile de acest tip pot fi numite *sinapse*, în mod curent însă acest termen desemnînd numai contactele dintre neuroni. Joncţiunile neuromusculare (sau mioneurale) se numesc *plăci motorii* (PM).

Lunga dispută dintre teoria continuităţii şi cea a contiguităţii structurale a joncţiunilor neuroneuronale şi neuroefectorii şi-a avut corespondentul şi în ceea ce priveşte mecanismul de transmitere a excitaţiei prin aceste zone. Continuitatea structurală ar implica în mod evident transmiterea semnalului prin acelaşi tip de mecanism care operează la nivelul membranei axonale, deci prin curenţi electrici locali, în timp ce discontinuitatea impune considerarea unor mesageri, a unor molecule cu rol de *mediatori chimici*, eliberate de către o celulă şi care să inducă excitaţia în membrana celeilalte celule.

În 1909, J. N. Langley a arătat că nicotina stimulează regiunea plăcilor motorii, că acest efect continuă chiar cînd s-a produs degenerescenţa terminaţiilor nervoase în urma secţionării nervului (degenerescenţa walleriană) şi că acţiunea stimulatoare a nicotinei este blocată de curara într-o măsură dependentă de concentraţiile relative ale celor două substanţe. Atît curara, cît şi nicotina se ataşează competitiv de aceleaşi formaţiuni *receptoare*, legarea curarei blocînd

acţiunea mediatorului chimic normal, iar nicotina mimînd acţiunea acestuia.

În experienţele sale clasice din 1921, O. Loewi a arătat că stimularea ramurii cardiace a nervului vag determină apariţia în lichidul de perfuzie (al unei inimi izolate de broască) a unei substanţe, numită de el „substanţă vagală", care face ca simpla transferare a acestui fluid la o altă inimă să o inhibe pe aceasta în mod similar. Stimularea fibrelor simpatice aferente inimii, al căror efect este de a accelera ritmul bătăilor, determină eliberarea unei substanţe, numită de Loewi „simpatină", al cărei efect poate fi de asemenea transferat altei inimi prin lichidul de perfuzie. „Substanţa vagală" s-a dovedit a fi acetilcolina (AcCh) iar în 1946 U. von Euler a identificat „simpatina" cu noradrenalina.

În 1936 H. Dale şi colaboratorii săi au arătat că stimularea nervului motor al unui preparat neuromuscular determină apariţia în lichidul de perfuzie a AcCh, dacă hidroliza ei enzimatică este blocată. Această eliberare de AcCh nu este afectată atunci cînd contracţia muşchiului este blocată de curara, fiind deci independentă de funcţionarea celulei postsinaptice. Ca o probă directă a rolului de mediator al AcCh, ei au arătat că injectarea acestei substanţe într-o arteră apropiată produce o secusă rapidă atît într-un muşchi normal, cît şi în unul denervat.

În 1938 H. Göpfert şi H. Schaefer, iar apoi J. C. Eccles şi W. O'Connor au descoperit că impulsul de pe fibra nervoasă motorie nu produce direct potenţialul de acţiune al fibrei musculare, ci între ele se interpune o depolarizare locală, nepropagabilă, a membranei postsinaptice, acest fenomen electric fiind potenţialul plăcii motorii (PPM). PPM are toate caracteristicile răspunsurilor electrice locale şi el reprezintă un caz particular de potenţial de joncţiune indus de o terminaţie nervoasă în celula cu care face contact sinaptic. Potenţialul de joncţiune constituie în general stimulul nemijlocit ce generează potenţialul de acţiune în celula postjoncţională. PPM de la muşchii scheletali ai vertebratelor sînt numai excitatoare, dar atunci cînd celula postjoncţională are o funcţie integratoare, aşa cum este cazul celulelor din sistemul nervos central, ele au şi potenţiale de joncţiune inhibitoare, rolul acestora fiind să regleze efectul potenţialelor excitatoare. La nevertebrate, unde datorită simplităţii sistemului nervos integrarea se produce şi la nivelul

celulelor efectoare, fibrele musculare prezintă şi potenţiale de joncţiune inhibitoare.

P. Fatt şi B. Katz au observat în 1950 că şi în stare de repaus la nivelul plăcii motorii se pot înregistra potenţiale miniaturale (mPPM) cu o amplitudine în jur de 0,5 mV şi care apar în mod aleatoriu. În afara caracterului spontan şi a valorii foarte mici, mPPM sînt identice din punct de vedere farmacologic cu PPM produse de impulsul nervos. Cercetările ulterioare ale lui B. Katz şi grupul său au dus la înţelegerea faptului că veziculele presinaptice evidenţiate la microscopul electronic de către E. De Robertis conţin cantităţi aproximativ constante de mediator chimic şi că mPPM exprimă spargerea spontană în stare de repaus a unora din aceste vezicule. Impulsurile care vin pe fibrele nervoase aferente determină spargerea simultană a unui mare număr de vezicule şi apariţia PPM.

Influenţarea celulei postsinaptice datorită eliberării de mediator chimic prin neurosecreţia terminaţiilor neuronului presinaptic reprezintă principala modalitate prin care se realizează comunicările intercelulare neuro-efectorii şi neuro-neuronale la mamifere. În jurul anului 1960 s-a dovedit însă cert că numeroase sinapse la nevertebrate şi unele chiar la vertebrate funcţionează fără etapa intermediară a medierii chimice, ci prin excitare electrică directă între celule. Furshpan şi Potter (1959) au descris astfel de sinapse electrotonice excitatoare în cordonul nervos abdominal al racului, iar Furukawa şi Furshpan (1963) au descris sinapse inhibitoare ale celulelor Mauthner din creierul de caras, iar ulterior s-au găsit numeroase cazuri de cuplaj electrotonic între celule excitabile (Bennett, 1973).

V.1. CONDIŢIILE STRUCTURALE PENTRU TRANSMISIA SINAPTICĂ PRIN MEDIATORI CHIMICI ŞI PRIN CURENT ELECTRIC

Transmisia de la o celulă excitabilă la alta prin intermediul unei substanţe sau direct prin curenţi locali de tipul acelora prin care se propagă potenţialul de acţiune (PA) în aceeaşi celulă sînt două modalităţi de comunicare intercelulară cu caracteristici distincte, care se produc în condiţii diferite din punctul de vedere al anatomiei celulelor aflate în contact şi care corespund unor funcţii fiziologice diferite.

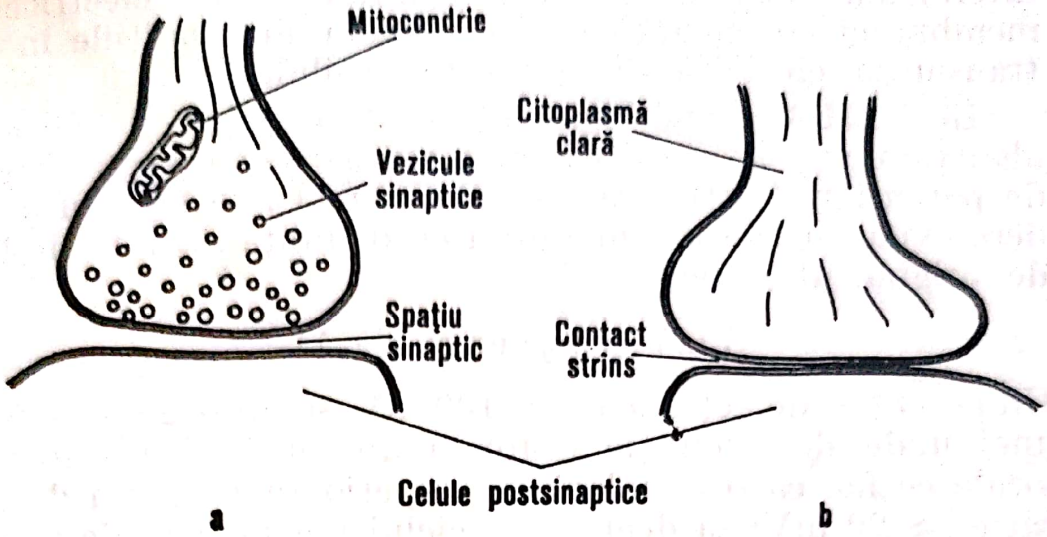


Fig. V.1.: Aspectul contactului intercelular la sinapse cu transmitere chimică (*a*) și electrică (*b*).

În fig. V.1a este reprezentat schematic contactul intercelular într-o sinapsă cu transmitere chimică iar în fig. V.1b contactul intercelular la o sinapsă electrică, ambele reprezentări fiind bazate pe datele furnizate de microscopia electronică.

Din punct de vedere structural, principalele deosebiri între sinapsele chimice și cele electrice sînt următoarele:

a) În cazul sinapselor chimice suprafața de contact dintre celule este foarte mică în raport cu suprafața totală a celulei postsinaptice, în timp ce la sinapsele electrice suprafața de contact este o parte considerabilă din aceasta;

b) Spațiul sinaptic dintre membranele celor două celule este considerabil la sinapsele chimice (aproximativ 200 Å sau mai mult), în timp ce la sinapsele electrice membranele celor două celule apar în contact;

c) Ultrastructura celulară în general și organitele prezente în celula presinaptică și în cea postsinaptică în special sînt diferite la sinapsele chimice, în timp ce la sinapsele electrice se constată o remarcabilă simetrie ultrastructurală a celor două celule. Astfel, la sinapsele chimice în zona presinaptică sînt numeroase mici formațiuni aproximativ sferice, iar mitocondriile sînt mult mai numeroase decît în zonele învecinate ale axonului.

Pe baza caracteristicilor structurale ale diferitelor contacte intercelulare se poate demonstra faptul că la joncțiuni de tipul plăcii motorii transmisia nu se poate face decît cu un

intermediar care să modifice caracteristicile electrice ale membranei postsinaptice şi se pot stabili condiţiile în care transmisia electrică directă este posibilă.

În § III.3.1, unde s-au discutat proprietăţile de cablu ale axonilor, s-a arătat că propagarea pasivă a unei variaţii de potenţial electric transmembranar (V) se face cu o scădere exponenţială a semnalului cu distanţa : x faţă de locul de origine al variaţiei V_0 :

$$V(x) = V_0 \cdot \exp(-x/\lambda).$$

Un potenţial de acţiune de $\approx$ 100 mV se propagă sub forma unei unde de excitaţie datorită „bateriilor" membranare locale ce fac ca o depolarizare superioară pragului de excitaţie ($\approx$ 20 mV) să declanşeze ciclul regenerativ de variaţie a permeabilităţii membranei. Deoarece pragul de excitaţie este de numai 20 mV faţă de amplitudinea de 100 mV a PA, rezultă că şi în condiţiile în care o anumită zonă a membranei este făcută inexcitabilă (prin răcire locală sau prin anestezie) semnalul se poate totuşi propaga pe o distanţă x dată de condiţia :

$$\frac{V(x)}{V_0} \geqslant \frac{20}{100}, \text{ adică } \exp(-x/\lambda) \geqslant 1/5, \text{ deci : } x \leqslant \lambda \cdot \ln 5.$$

Constanta spaţială λ, definită în § III.3.1., este determinată de proprietăţile electrice ale axonului şi de dimensiunile sale. Pentru un axon nemielinizat cu diametrul de 5 μm, $\lambda \approx 1$ mm, deci pentru a bloca propagarea impulsului trebuie ca fibra să fie făcută inexcitabilă pe o porţiune de cel puţin 2 mm. Propagarea impulsului poate fi însă oprită dacă structura de cablu nu mai este continuă, ci apare o întrerupere. Impedanţa cablului echivalent unui axon cu diametrul de 5 μm este de $2 \cdot 10^7$ Ω (Katz, 1966) (fig. V.2 a). Dacă axonul este separat în două şi cele două capete sînt acoperite cu acelaşi tip de membrană şi separate printr-un spaţiu de 150 Å umplut cu lichid interstiţial, aşa cum este în cazul sinapselor, un semnal care vine din prima porţiune va întîlni o impedanţă de intrare de $3 \cdot 10^9$ Ω corespunzătoare membranei presinaptice, şuntată de o rezistenţă de $3 \cdot 10^6$ Ω, corespunzătoare spaţiului sinaptic şi continuîndu-se cu $3 \cdot 10^9$ Ω (membrana postsinaptică) în serie cu impedanţa de $2 \cdot 10^7$ Ω a cablului (fig. V.2 b).

Chiar în condiţiile în care membrana presinaptică este în stare de excitaţie, impedanţa ei reducîndu-se la $2 \cdot 10^8$ Ω

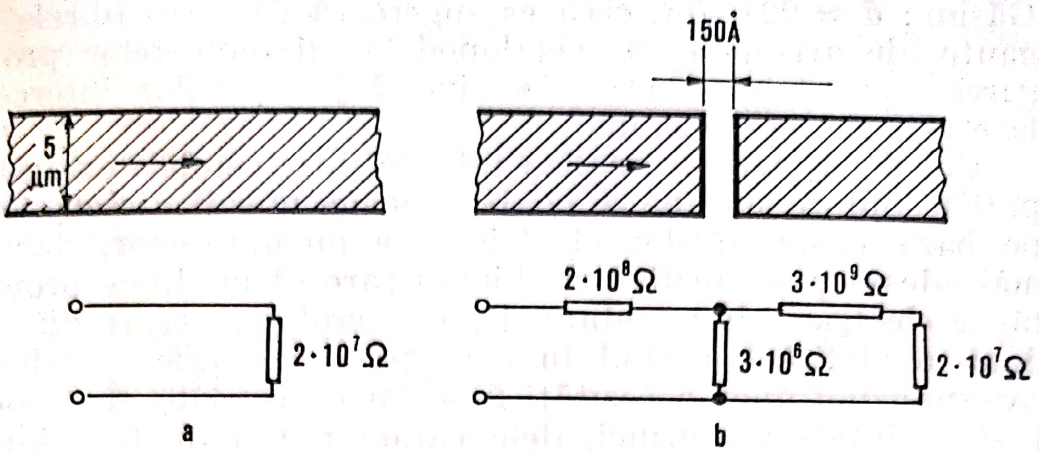


Fig. V.2. (după Katz, 1966): Impedanțele echivalente pentru propagarea potențialului de acțiune printr-un axon nemielinizat cu diametrul de 5 μm (*a*) și la o joncțiune între doi axoni de acest fel separați printr-un spațiu de 150 Å umplut cu lichid interstițial (*b*).

în loc de $3 \cdot 10^9\ \Omega$, un semnal electric nu va trece din porțiunea presinaptică în cea postsinaptică decît cu un coeficient de atenuare de 10^{-4}*, astfel încît este imposibil să mai fie atins pragul de excitație. În cazul joncțiunilor neuromusculare atenuarea este încă mult mai mare căci spațiul sinaptic este mai larg de 150 Å iar suprafața terminațiilor axonale fiind mult mai mică decît a fibrei musculare, ele nu îi pot furniza acesteia suficient curent pentru a o depolariza. Apare deci clar că în condiții structurale de tipul celor de mai sus este imposibilă propagarea unui semnal electric excitator din zona pre- în cea postsinaptică.

Situația devine însă diferită pe măsură ce suprafața joncțiunii crește căci în timp ce rezistența de șunt a spațiului sinaptic nu depinde decît de lărgimea acestui spațiu, nu și de diametrul celor două celule aflate în contact, impedanța membranei postsinaptice scade proporțional cu suprafața, adică invers proporțional cu diametrul la pătrat. Putem astfel deduce pentru ce valoare a diametrului (d) devine posibilă propagarea unui semnal din zona pre- în cea postsinaptică cu o atenuare de 1/5 în loc de 10^{-4}.

$$10^{-4}(d/5)^2 = 1/5.$$

---

* Semnalul care se propagă în impedanța de $2 \cdot 10^7$ a „cablului postsinaptic" este proporțional cu raportul de $2 \cdot 10^7/3 \cdot 10^9$, restul fiind atenuat de membrana postsinaptică. În zona postsinaptică pătrunde însă efectiv numai o fracțiune de $3 \cdot 10^6/2 \cdot 10^8$ din semnalul inițial, restul închizîndu-se prin șuntul reprezentat de spațiul sinaptic. În ansamblu deci atenuarea semnalului este de $(2 \cdot 10^7/3 \cdot 10^9) \times (3 \cdot 10^6/2 \cdot 10^8) = 10^{-4}$.

Găsim : $d \approx 224$ μm, ceea ce sugerează că între fibrele gigante ale artropodelor, cefalopodelor şi moluştelor propagarea semnalului electric la nivelul joncţiunilor intercelulare este perfect posibilă.

Concluzia acestei analize este că între celulele excitabile potenţialul de acţiune se poate propaga uneori direct numai pe baza proprietăţilor electrice ale membranelor, dar cel mai adesea prin mediatori chimici care să modifice proprietăţile electrice ale membranei postsinaptice, fiecare din cele două modalităţi operînd în condiţii structurale specifice şi corespunzînd unor necesităţi funcţionale diferite. În tabelul 1 sînt sintetizate principalele caracteristici de funcţionare ale celor două tipuri de sinapse. Uneori joncţiunile dintre neuroni pot avea şi un caracter mixt, constînd dintr-o porţiune în care transmisia se face unidirecţional prin mediator chimic şi o alta în care se face bidirecţional prin curenţi electrici locali (Bodian, 1972).

TABELUL V.1

Principalele particularităţi distinctive ale funcţionării sinapselor chimice şi electrice

Sinapse cu mediator chimic	Sinapse cu transmitere electrică
Sensul de propagare al excitaţiei este strict unidirecţional, putînd fi astfel definite celula pre- şi celula postsinaptică. Sinapsele chimice sînt „valvele" care asigură numai transmisia ortodromică în lanţurile polineuronale.	Excitaţia se propagă de regulă bidirecţional, deşi unul din sensuri poate fi preferenţial.
Între sosirea potenţialului de acţiune la terminaţiile axonale presinaptice şi apariţia depolarizării locale în celula postsinaptică este o latenţă (întîrzierea sinaptică) de aproximativ 0,5 ms, acest timp corespunzînd etapei de mediere chimică.	Nu este o astfel de întîrziere, propagarea excitaţiei de la o celulă la alta făcîndu-se cu aceeaşi viteză cu care se propagă potenţialul de acţiune în axon.
Temperatura influenţează puternic transmisia.	Efectul temperaturii este mult mai puţin important.
Procesele care au loc atît la nivelul membranei presinaptice cît şi al celei postsinaptice pot fi modificate prin agenţi chimici.	Nu prezintă sensibilitate specifică faţă de agenţi chimici.
Curenţii electrici presinaptici nu au decît un efect neglijabil asupra potenţialului membranei postsinaptice, aceasta fiind practic inexcitabilă electric.	Curenţii presinaptici sînt factorul nemijlocit prin care se transmite excitaţia.

Trebuie subliniat faptul că modalitatea net predominantă, cel puţin în cazul vertebratelor superioare, prin care se realizează transmisia sinaptică este prin mediatori chimici. De aceea vom insista asupra mecanismelor biofizice ale acestui tip de transmisie, referindu-ne mai ales la procesele care au loc la nivelul plăcilor motorii, acolo unde au fost cel mai bine elucidate.

V.2. SUCCESIUNEA DE PROCESE DIN CARE CONSTĂ TRANSMISIA CHIMICĂ SINAPTICĂ

Principalele caracteristici structurale ale unei plăci motorii, aşa cum au fost deduse pe baza imaginilor electronomicroscopice corelate cu datele referitoare la funcţionarea acestor joncţiuni, sînt schematizate în fig. V.3. Pentru a avea o imagine de ansamblu asupra propagării între celule a excitaţiei electrice prin intermediul mediatorilor chimici, în fig. V.4 este prezentată succesiunea proceselor, de la potenţialul de acţiune al fibrei nervoase pînă la potenţialul de acţiune al celulei musculare.

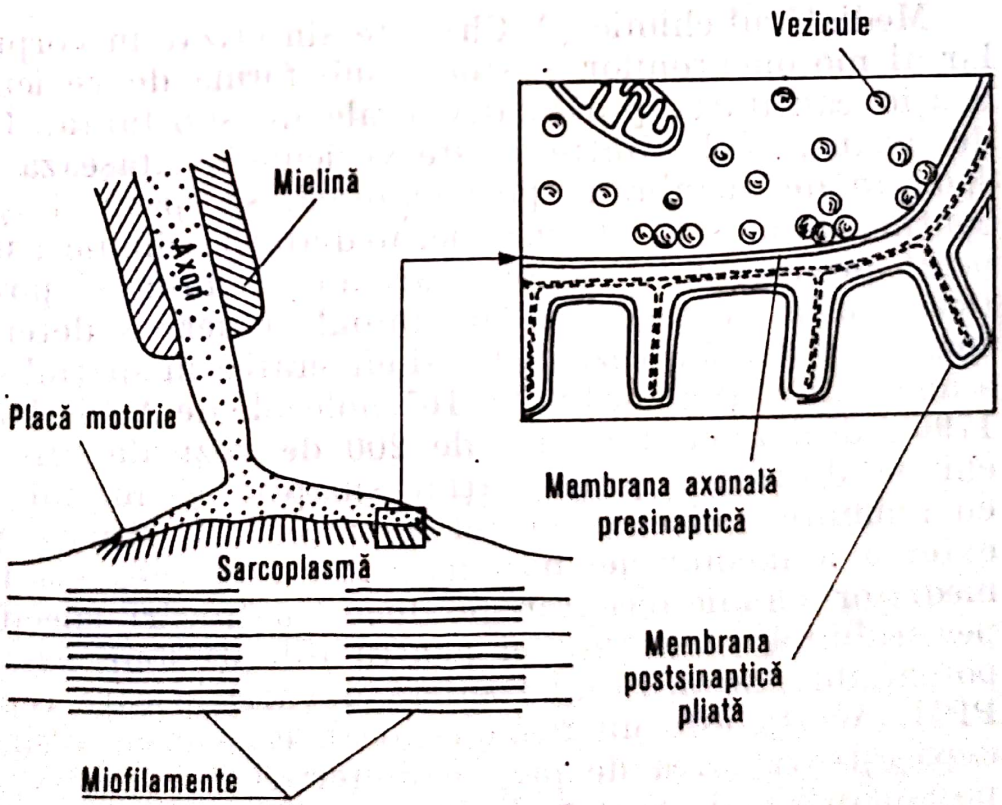


Fig. V.3. : Reprezentarea schematică a structurii joncţiunilor neuromusculare, cu detalierea zonei de contact intercelular.

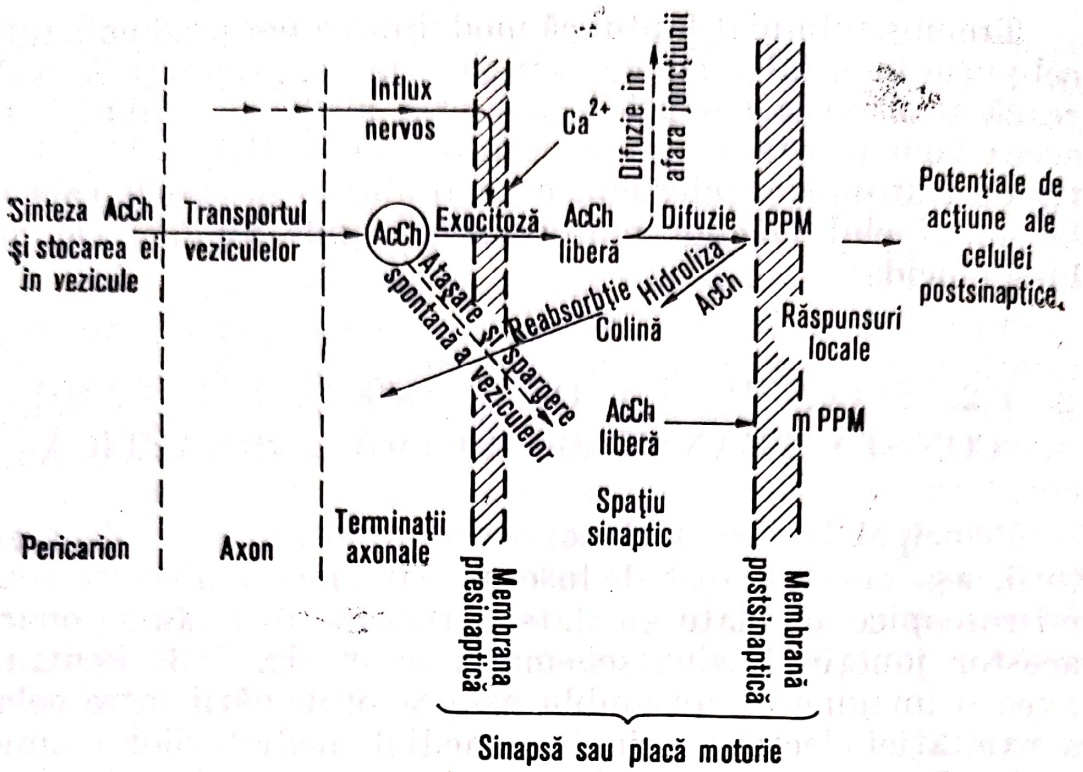


Fig. V.4. : Succesiunea și localizarea proceselor din care constă transmisia sinaptică.

Mediatorul chimic (AcCh) este sintetizat în corpul celular al motoneuronilor și stocat sub formă de vezicule care conțin cantități aproximativ egale de substanță. În stare de repaus, unele dintre aceste vezicule se atașează în mod spontan de membrana postsinaptică, se sparg și își varsă conținutul în spațiul sinaptic. Mediatorul chimic astfel eliberat produce mici depolarizări ale membranei postsinaptice exprimate prin mPPM. Impulsul nervos determină o spargere masivă a veziculelor și eliberarea în spațiul sinaptic a unei cantități de ordinul a 10^7 molecule de AcCh (Hubbard, 1790), deci a unui număr de 200 de vezicule. Mediatorul chimic difuzează prin spațiul sinaptic și interacționează cu anumite molecule cu rol de receptori, situate pe fața externă a membranei postsinaptice. Formarea complexelor mediator chimic-receptor produce modificări specifice ale permeabilității membranei pentru diferiți ioni, astfel încît potențialul de membrană suferă o variație care reprezintă PPM. Acesta este un răspuns local, care însă, atunci cînd depășește valoarea de prag caracteristică respectivei celule postsinaptice, dă naștere PA propagabil care în fibrele musculare declanșează contracția. Tot pe membrana postsi-

naptică este şi o enzimă, acetilcolinesteraza (AChE) care hidrolizează mediatorul chimic AcCh transformîndu-l în precursorii din care provine, iar aceştia sînt parţial reabsorbiţi în porţiunea presinaptică, servind la ulterioara sinteză de mediator.

V.2.1. Sinteza şi hidroliza enzimatică a acetilcolinei

Pentru ca AcCh să poată media transmiterea excitaţiei de la terminaţiile axonale la fibrele musculare sînt două condiţii evidente:

a) neuronii să conţină echipamentul enzimatic necesar sintezei acestui ester, cu atît mai mult cu cît în cursul unei stimulări îndelungate un neuron eliberează mai multă AcCh decît cantitatea totală pe care o conţine la un anumit moment dat (Potter, 1970);

b) pe membranele postsinaptice ale fibrelor musculare trebuie să fie o enzimă capabilă să hidrolizeze în 1—2 ms toată cantitatea de AcCh eliberată de terminaţiile nervoase, pentru ca fibra să poată răspunde la un nou stimul.

Într-adevăr, în neuronii colinergici există enzima colinacetiltransferază (Nachmansohn, 1960) care catalizează acetilarea colinei, iar în zonele postsinaptice este acetilcolinesteraza (AChE) care hidrolizează rapid AcCh (Couteaux, 1958).

Acetilarea se produce în două etape:

1) acetatul se combină cu coenzima A în prezenţa ATP:

$$\text{Acetat} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftarrows \text{Acetil-CoA} + \text{AMP} + \text{Pirofosfat}$$

formînd acetil-coenzima A, adică acetat „activ";

2) Acetil-CoA împreună cu colina, în prezenţa colinacetiltransferazei dă AcCh:

$$\text{Acetil-CoA} + \text{Colină} \underset{\text{transferază}}{\overset{\text{Colinacetil-}}{\rightleftarrows}} \text{AcCh} + \text{Co} - \text{A}$$

Colinacetiltransferaza se găseşte în citoplasma neuronilor colinergici, iar AcCh sintetizată în citoplasmă este stocată sub formă de vezicule, fiind astfel protejată de hidroliza la care ar fi supusă sub acţiunea AChE care de asemenea se găseşte şi în citoplasma neuronilor. Majoritatea AChE

este concentrată în pliurile membranei postsinaptice, grupările ei reactive fiind expuse pe suprafaţa externă a membranei.

Hidroliza enzimatică a AcCh se produce în două etape, mai întîi formîndu-se un complex AChE — AcCh stabilizat prin forţe electrostatice şi van der Waals. Apoi enzima se acetilează şi elimină colina, iar în final enzima se regenerează eliminînd ionul acetat. Timpul de „turnover" pentru acest ciclu de hidroliză a fost estimat la aproximativ 0,1 ms (Lawler, 1961).

V.2.2. Veziculele cu mediatori chimici

Natura mediatorilor chimici secretaţi de neuroni, prin care se face transmisia sinaptică, face ca acest tip general de neurosecreţie să fie diferit de acela mai particular în care produsul este un hormon, ca de exemplu hormonii hipofizari. Cu toate acestea, mecanismele de secreţie a mediatorilor de către neuronii obişnuiţi, a hormonilor de către cei neurosecretori şi chiar mecanismele secreţiei din celulele aneurale sînt în linii mari aceleaşi. Ele constau din stocarea produsului de secreţie sub formă de granule sau vezicule şi eliberarea lui atunci cînd potenţialul membranei prejoncţionale este redus (depolarizare) în prezenţa ionilor Ca^{2+}. În general, ieşirea din celulă a conţinutului unei vezicule cu produs secretat se numeşte *exocitoză*, eliberarea mediatorilor chimici sinaptici fiind un caz particular de realizare a acestui proces.

Referitor la locul de constituire a veziculelor cu mediatori chimici, opiniile sînt încă divergente, unii autori susţinînd că este în corpul celular (soma neuronală), de unde sînt transportate la locurile de secreţie, în timp ce alţii consideră că la locurile de secreţie se produce şi formarea veziculelor de către neurotubuli sau de reticulul endoplasmic, sau de mitocondrii. O trecere în revistă a argumentelor a fost făcută de Hubbard (1970). Cele mai sigure dovezi vin în sprijinul ideii că veziculele se formează în soma neuronală şi sînt transportate de-a lungul axonului spre locul de eliberare a mediatorului (fig. V.5) cu o viteză de circa 5 mm/oră (Livett şi colab., 1968).

Aspectul veziculelor apare diferit în funcţie nu numai de tipul de mediator pe care îl conţin, ci mai ales de procedeul

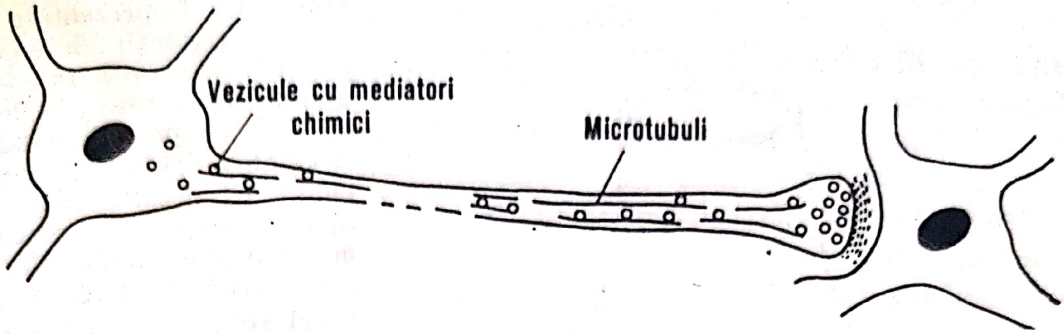


Fig. V.5. : Circulaţia veziculelor cu mediator chimic din zona neuronală pînă în terminaţiile sinaptice.

prin care au fost evidenţiate, adică de fixarea şi colorarea ţesutului nervos (Akert şi colab., 1970).

Veziculele cu AcCh de la nivelul plăcilor motorii au un diametru mediu de 500 Å, sînt de regulă înconjurate de o membrană de 40—50 Å şi nu prezintă nici o structurare în interiorul lor.

Veziculele nu sînt distribuite omogen în interiorul terminaţiilor axonale, fiind concentrate în vecinătatea zonei presinaptice, unde densitatea lor este de ordinul a $10^3 \mu m^3$ (Hubbard şi Kwanbunbumpen, 1968). Ele par lipite de membrana presinaptică sau chiar fuzionate cu aceasta, exact în dreptul acelor plieri ale membranei postsinaptice care conţin cantitatea cea mai mare de AChE şi probabil şi receptorul de AcCh. Existenţa pe membrana presinaptică a unor zone active, specializate pentru ataşarea veziculelor cu mediator, a fost dovedită electrono-microscopic (Couteaux şi Pécot-Dechavassine, 1974). În fig. V.6 este schematizat interiorul unei terminaţii axonale pe baza imaginilor obţinute în microscopia electronică.

O vezicule sferică cu diametrul de 500 Å şi cu peretele gros de 50 Å poate cuprinde 45 000 molecule de clorură de acetilcolină în formă cristalină, astfel încît acest număr pare a fi limita teoretică superioară a conţinutului unei vezicule. Sînt mai multe modalităţi experimentale de a estima conţinutul unei vezicule. Astfel, pentru ca prin aplicare iontoforetică să fie indus un mPPM sînt necesare aproximativ 10^5 molecule de AcCh; însă este de presupus că în mod natural sînt necesare mai puţine molecule datorită plasării foarte eficiente a locurilor de eliberare în imediata vecinătate a zonelor receptoare. Alte genuri de estimări se bazează pe dozarea cantităţii de mediator eliberat de un

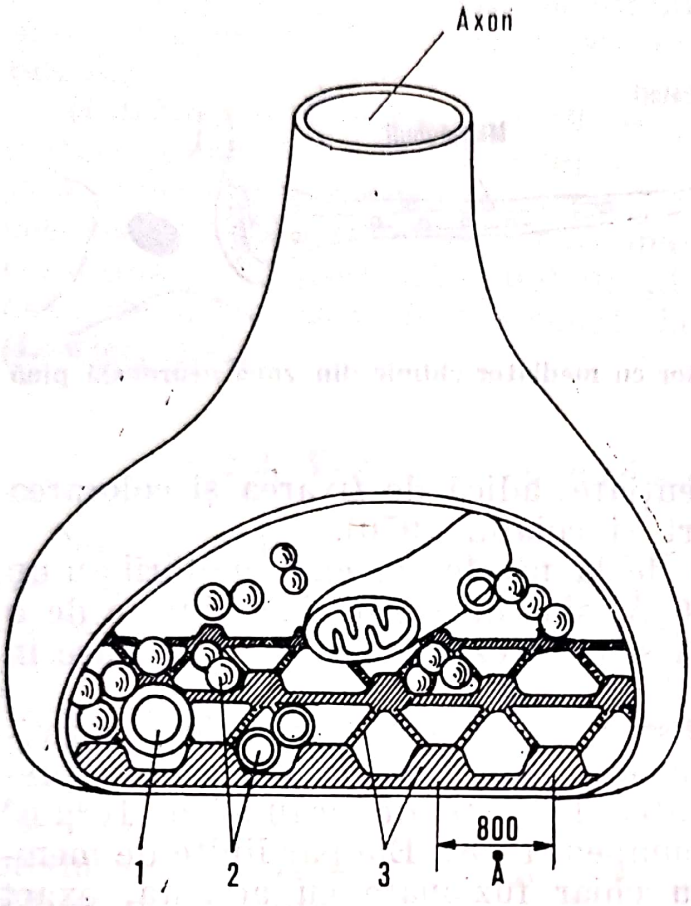


Fig. V.6. : Reprezentare a unei terminaţii axonale presinaptice, pe baza imaginilor de microscopie electronică (după Pfenninger şi colab., 1969). 1 — vezicule mari al căror conţinut apare opac; 2 — vezicule cu mediator chimic; 3 — reţea triunghiulară în ale cărei spaţii se acumulează veziculele.

nerv stimulat şi pe cunoaşterea morfologică a numărului de plăci motorii odată cu deducerea (pe baza amplitudinii PPM) numărului de vezicule eliberate la o placă motorie (Straughan, 1960; Krnjević, 1974). Pe această cale s-au găsit valori în jur de $5 \cdot 10^4$ molecule de AcCh într-o veziculă ceea ce ar implica o dispunere foarte strînsă a acestora pentru a fi la limita teoretică de umplere a veziculei.

V.2.3. Mecanismul de spargere a veziculelor cu mediatori

Descoperirea aproape simultană, în 1955, a caracterului cuantificat al secreţiei de AcCh — exprimat prin cuantificarea potenţialelor postsinaptice — şi a veziculelor sinaptice din terminaţiile nervoase a condus în mod logic la identificarea acestor vezicule cu cuantele de mediator.

Pentru a explica apariţia mPPM spontane, del Castillo şi Katz (Katz, 1969) au presupus că veziculele sinaptice sînt, datorită agitaţiei termice, într-o mişcare de tip brow-

nian, ciocnind membrana presinaptică. O vezicula se ataşează de membrană numai dacă ciocnirea se face astfel, încît anumite locuri receptoare complementare să vină în contact (fig. V.7 *a* şi *b*). Pentru explicarea PPM se postulează că impulsul nervos creşte numărul de locuri reactive de pe membrană, pentru a căror funcţionare este necesar Ca^{2+}. Depolarizarea membranei terminale a axonului deschide un canal al calciului, iar acesta intrînd în membrană participă la o reacţie care stimulează eliberarea de mediator (Katz şi Miledi, 1967). Aceste procese implică un timp care reprezintă o parte considerabilă din întîrzierea sinaptică. Printr-o tehnică de analiză a luminii laser difuzată de veziculele sinaptice, Shaw şi Newby (1972) au observat că veziculele au mişcări ample numai atunci cînd terminaţiile nervului sînt depolarizate în prezenţa Ca^{2+}. Ei presupun că depolarizarea, permiţînd intrarea Ca^{2+}, determină lichefierea axoplasmei (care altfel este un gel), aşa încît veziculele devin libere şi suferă mişcarea browniană.

Ipoteza agitaţiei termice a veziculelor este sprijinită de datele privind efectul temperaturii asupra frecvenţei mPPM (Liley, 1965 ; Ward şi colab., 1972) care arată că în general între această frecvenţă ν şi temperatura măsurată în scara absolută, T, este o relaţie logaritmică de tipul ecuaţiei lui Arrhenius :

$$\ln(\nu) = a - b/T,$$

unde a şi b sînt constante. O astfel de relaţie poate fi explicată pe baza intensificării agitaţiei termice a veziculelor odată cu creşterea temperaturii. Existenţa unor locuri specializate pentru ataşarea veziculelor pe membrana presinaptică este de asemenea confirmată de datele electronomicroscopice (Pfenninger şi colab., 1969).

Pe baza acestor două ipoteze, spargerea veziculelor cu mediator ar urma să fie un proces stochastic (aleatoriu) guvernat de legea statistică a evenimentelor cu foarte mică probabilitate de producere, legea lui Poisson, ceea ce în general se confirmă (paragraful următor). Pe de altă parte însă, mişcarea veziculelor datorită agitaţiei termice ar implica o distribuire uniformă a lor în terminaţiile axonale, ceea ce nu este real. Dealtfel nici distribuţia de tip Poisson a amplitudinilor PPM nu este o regulă generală, abaterile constatate nefiind datorate exclusiv erorilor experimentale, ci reflectînd insuficienţa ipotezelor asupra mecanismului

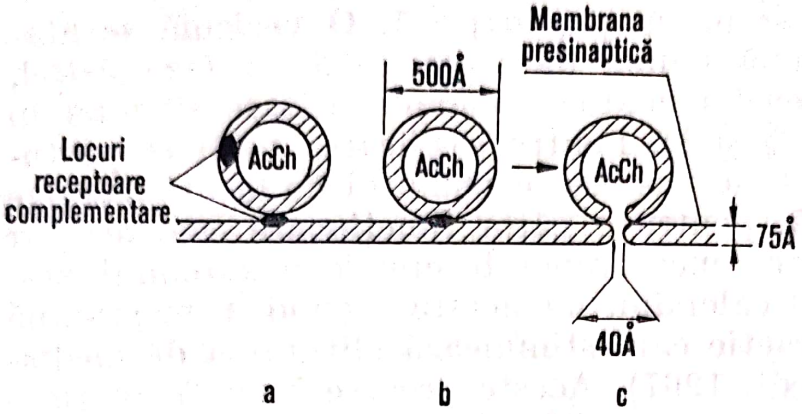


Fig. V.7. : Reprezentare schematică a procesului de atașare a veziculelor cu mediatori chimici de membrana presinaptică. (*a*) ciocnire neeficientă datorită necorespondenței locurilor receptoare de pe vezicule și membrana presinaptică ; (*b*) ciocnire eficientă, urmată de (*c*) fuziune și exocitoză.

Faptul că ionul Ca^{2+} este esențial pentru desfășurarea normală a eliberării de mediatori chimici din terminațiile nervoase, ca și pentru alte procese de exocitoză, este ferm dovedit experimental. Explicațiile asupra modalității prin care Ca^{2+} reglează exocitoza sînt însă multiple :

a) necesitatea acestui ion pentru o reacție enzimatică ce ar avea loc atunci cînd se formează deschiderea din membrana veziculei și din membrana presinaptică prin care este vărsat conținutul de mediator ;

b) locurile reactive de pe membrana presinaptică ar permite aderarea veziculelor numai atunci cînd au calciu legat pe ele ;

c) fiind bivalent, calciul ar putea servi ca punte între grupările negative de pe suprafața veziculei și de pe fața internă a membranei presinaptice, permițînd astfel un contact strîns între acestea (Hubbard și colab., 1968) ;

d) legarea Ca^{2+} pe suprafețele particulei și/sau a membranei presinaptice ar reduce bariera de energie electrostatică de repulsie dintre cele două suprafețe, facilitînd astfel ciocnirea eficientă (Cooke și colab., 1973 ; Dean, 1975).

În contrast cu ipoteza locurilor complementare de pe membrană și de pe vezicule, specializate pentru atașarea acestora, Bass și Moore (1966) au sugerat că veziculele își descarcă conținutul ori de cîte ori capătă, datorită agitației termice, suficientă energie pentru a depăși bariera energetică de repulsie electrostatică și de obstrucționare mecanică datorită stratului de molecule de apă adsorbit pe vezicule.

Ulterior, Remler (1973) a dedus statistica eliberării cuantelor de mediator pe baza aceleiaşi presupuneri că forţele electrice şi de agitaţie termică pot explica integral deplasarea veziculelor, considerînd însă că pentru descărcarea conţinutului vezicula nu poate intra în contact direct cu membrana presinaptică decît îndepărtînd stratul de apă adsorbit pe aceasta (fig. V.8).

Depolarizarea membranei presinaptice datorită impulsului nervos ar determina spargerea masivă a veziculelor, datorită efectului nemijlocit de scădere a barierei energetice.

Teoriile elaborate de Bass şi Moore (1966) şi de Remler (1973) sînt atractive prin aceea că propun o bază fizică raţională şi o tratare teoretică detaliată a fenomenului de ataşare a veziculelor de membrana terminaţiilor nervoase, însă în general nu sînt acceptate din următoarele motive. Dacă accesul veziculelor la membrană ar fi împiedicat de stratul de apă adsorbit pe ele sau pe membrană, ar urma ca gradienţii de presiune osmotică, prin care acest strat este deplasat, să aibă un efect multiplicativ cu cel produs prin depolarizare, ceea ce nu se confirmă. Se dovedeşte că depolarizarea, deci reducerea barierei electrostatice, nu modifică direct mişcarea veziculelor, căci eliberarea mediatorului se produce de fapt abia după repolarizarea membranei. În sfîrşit, aşa cum am menţionat de la început, acest gen de teorii nu ţin seama de specializarea anatomică a locurilor de eliberare a veziculelor de pe membrana presinaptică.

Cu toată relativa abundenţă de ipoteze incomplete, se poate aprecia că în linii mari mecanismul exocitotic al eli-

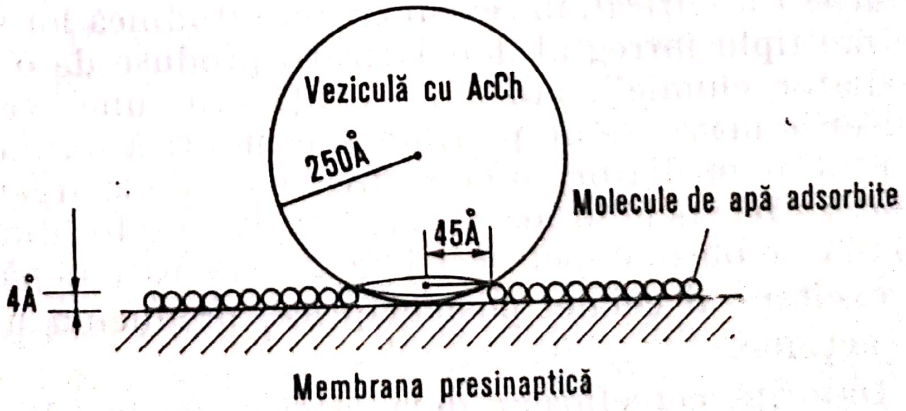


Fig. V.8. : Reprezentare schematizată pentru ilustrarea teoriei lui Remler (1973) asupra ataşării veziculelor cu mediator. Pentru a fi în contact cu membrana, o vezicula cu raza de 250 Å trebuie să îndepărteze moleculele de apă de pe o suprafaţă cît a unui cerc cu raza de 45 Å, adică aproximativ 100 molecule.

berării veziculelor cu mediator chimic poate fi înţeles în mod coerent prin raportare la teoria locurilor complementare, a mişcării de agitaţie termică şi a rolului Ca^{2+} de a aduce în contact vezicula şi membrana. Principalul element necunoscut rămîn fenomenele care au loc între depolarizarea membranei datorită PA al nervului, intrarea Ca^{2+} şi care preced vărsarea conţinutului de mediator în spaţiul sinaptic.

V.2.4. Caracterul cuantificat al eliberării mediatorului

Înregistrarea potenţialelor miniaturale ale plăcii motorii (mPPM) care apar spontan, dar au aceleaşi sensibilităţi farmacologice ca şi PPM induse de impulsul nervos, corelată cu demonstrarea prin tehnica de iontoforeză a faptului că cel mai mic mPPM este produs de acea cantitate de ACh care se estimează a fi într-o vezicule presinaptică, sugerează că mPPM apar ca rezultat al eliberării spontane a unor vezicule cu mediator sinaptic. Argumente puternice în acest sens sînt abolirea mPPM de către toxina botulinică al cărei efect specific este de a împiedica eliberarea ACh din terminaţiile nervoase (Brooks, 1956) ca şi dispariţia mPPM odată cu degenerescenţa walleriană (dezintegrarea terminaţiilor unui nerv secţionat) (Birks, Katz şi Miledi, 1960).

Deoarece mediatorul chimic se găseşte în terminaţiile presinaptice numai colectat în vezicule avînd aceleaşi dimensiuni, aproximativ 500 Å diametru, care prin spargere îşi varsă *tot* conţinutul în spaţiul sinaptic, este de aşteptat ca şi PPM produse de stimularea nervului să prezinte un *caracter cuantificat*, în sensul ca amplitudinea lor să fie mereu un multiplu întreg al depolarizării produse de o „cuantă de mediator chimic", adică de conţinutul unei vezicule. Impulsurile nervoase de pe fibra presinaptică nu modifică conţinutul de mediator, ci cresc frecvenţa de spargere a veziculelor, astfel încît în loc de mPPM cu amplitudine în jur de 0,5 mV se obţin depolarizări de 20 mV care depăşesc pragul de excitare al celulei postsinaptice, producînd un potenţial de acţiune.

Datorită cercetărilor deja clasice ale lui del Castillo şi Katz (1954) şi Boyd şi Martin (1956), a fost definitiv stabilit caracterul cuantificat al eliberării de mediator chimic, exprimat prin natura cuantificată a PPM. Concluziile acestor-

cercetări, prezentate pe larg de Martin (1966), pot fi sintetizate în următoarele afirmaţii :

1) neurosecreţia de mediator chimic se face numai sub formă de cuante prin eliberarea în spaţiul sinaptic a întregului conţinut din acele vezicule care se sparg ;

2) în starea de repaus a terminaţiilor nervoase presinaptice, spargerea veziculelor este un fenomen spontan şi aleatoriu cu o foarte mică probabilitate de producere, aşa cum arată frecvenţa medie de numai 1/s ;

3) mPPM reprezintă manifestarea electrică produsă la nivelul membranei postsinaptice de această neurosecreţie spontană, ele avînd deci acelaşi caracter aleatoriu şi cuantificat ;

4) impulsurile nervoase care sosesc la terminaţiile presinaptice cresc foarte mult probabilitatea de spargere a veziculelor şi deci numărul de vezicule care se sparg simultan, dar nu modifică conţinutul fiecărei vezicule.

Datorită reuşitei depline a teoriei transmisiei cuantificate de mediator chimic, merită să prezentăm în linii mari modalitatea concretă în care se fac analizele statistice prin care a fost stabilită. Caracterul cuantificat al potenţialelor plăcii motorii, nu numai al celor miniaturale spontane, ci şi al celor produse de stimularea nervului motor, a putut fi evidenţiat în condiţiile în care Ca^{2+} a fost parţial înlocuit cu Mg^{2+} în soluţia în care este plasat preparatul neuromuscular, pentru a reduce mult numărul de vezicule cu mediator care îşi varsă conţinutul.

Pe măsură ce eliberarea de mediator chimic este inhibată, amplitudinea PPM produse de impulsurile nervoase scade gradat, în trepte, iar imediat înainte de instalarea blocării complete aceste PPM evocate de stimularea nervului sînt identice cu mPPM care apar spontan.

În exemplul pe care îl prezentăm, Boyd şi Martin (1956) au înregistrat în astfel de condiţii de la o aceeaşi placă motorie mai întîi 78 de potenţiale spontane (mPPM) şi apoi PPM apărute ca rezultat al stimulării de 198 de ori a nervului cu cîte un impuls unic la intervale de cîteva secunde. Au grupat atît mPPM, cît şi PPM după amplitudini şi au reprezentat, sub forma histogramelor din fig. V.9, distribuţia numărului de potenţiale care au o anumită amplitudine.

Valoarea medie a amplitudinii mPPM este de 0,4mV, iar valoarea medie a PPM apărute după stimulare este de 0,933 mV. Admiţînd că fiecare PPM constă dintr-un număr

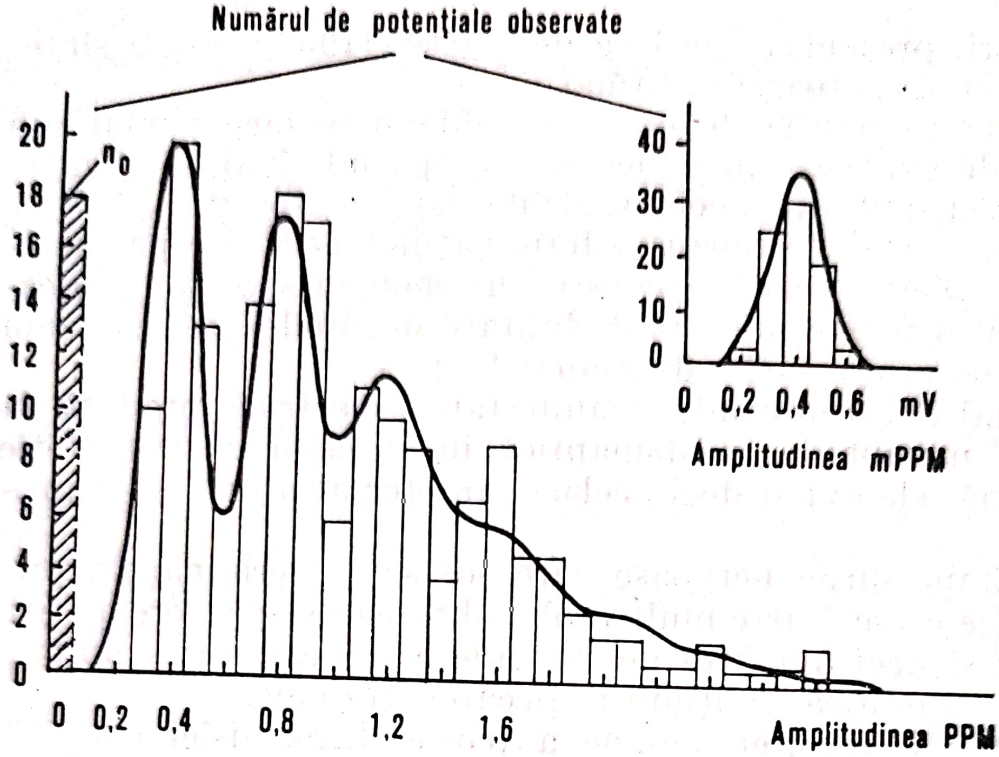


Fig. V.9. (după Boyd și Martin, 1956) : Analiza statistică a *PPM* și *mPPM* prin reprezentarea numărului de potențiale care au amplitudinile într-un anumit domeniu de valori. n_0 este numărul de cazuri în care impulsul de pe nervul presinaptic nu a determinat apariția vreunui PPM.

întreg de unități identice cu cele care formează potențialele spontane, rezultă că numărul mediu de astfel de unități per impuls, adică numărul mediu de vezicule cu mediator eliberate de un impuls în respectivele condiții este :

μ = amplitudinea medie a PPM/amplitudinea medie a mPPM = 0,933/0,4 = 2,33.

Deoarece numărul de vezicule existente în terminațiile nervoase este foarte mare — în jur de 300 000 după unele estimări (Hubbard, 1970) — iar fiecare impuls determină eliberarea doar a unui număr foarte mic de vezicule, înseamnă că probabilitatea P ca fiecare veziculă să se spargă este foarte mică : $P \ll 1$. În aceste condiții, probabilitatea P_x ca pentru un impuls să se spargă x vezicule este dată de legea evenimentelor rare, numită legea lui Poisson* :

$$P_x = (\mu^*/x!) \cdot \exp(-\mu),$$

unde μ este valoarea medie definită anterior.

* Pentru detalierea noțiunilor de calculul probabilităților pot fi consultate cursuri de matematici superioare, ca de exemplu :
I. Gh. Şabac, *Matematici speciale*, vol. II, Ed. did. şi ped., București, 1965 ;
A. D. Myskis, *Introductory Mathematics for Engineers*, Mir, Moscova, 1975.

Numărul de cazuri n_x în care un impuls determină spargerea a x vezicule este produsul dintre această probabilitate P_x şi numărul total N de înregistrări (în exemplul considerat $N = 198$):

$$n_x = NP_x = 198(2{,}33^x/x\,!)\exp(-\,2{,}33).$$

Se poate deci calcula ansamblul de valori: n_0, n_1, n_2,... reprezentînd respectiv numărul de cazuri în care impulsul nervos nu a dus la apariţia nici unui răspuns postsinaptic, deci nu a determinat spargerea nici unei vezicule, numărul de cazuri în care impulsul a determinat spargerea unei singure vezicule etc.

Pe histograma din fig. V.9 maximele apar pentru valori ale PPM care sînt multipli întregi ai amplitudinii medii a minipotenţialelor spontane, adică pentru 0,4 mV; 0,8 mV; 1,2 mV etc. Dacă sînt însumate toate cazurile grupate în jurul acestor maxime, numerele care se obţin sînt practic identice cu valorile teoretice n_0, n_1, n_2,... calculate pe baza legii de distribuţie a lui Poisson.

O altă posibilitate de verificare este legată de numărul n_0 de cazuri în care impulsul nervos nu produce nici un răspuns postsinaptic. Din legea lui Poisson: $n_0 = N \cdot \exp(-\,\mu)$, deci:

$$\mu = \ln(N/n_0) = \ln\left(\frac{\text{numărul total de cazuri}}{\text{numărul de cazuri fără răspuns postsinaptic}}\right)$$

iar anterior am văzut că prin definiţie:

$$\mu = \frac{\text{amplitudinea medie a PPM}}{\text{amplitudinea medie a mPPM}}.$$

Există deci două modalităţi diferite de a obţine μ pe baza aceleiaşi serii de experienţe, iar valorile obţinute sînt foarte concordante.

Concluzia finală este deci că amplitudinea potenţialelor postsinaptice ale plăcilor motorii este guvernată de legea lui Poisson a evenimentelor cu mică probabilitate de producere, aceste evenimente fiind în cazul sinapsei ciocnirea dintre vezicule şi membrana presinaptică în poziţia adecvată a locurilor complementare.

Studiile statistice asupra potenţialelor postsinaptice evocate de impulsurile nervoase s-au rafinat foarte mult, importanţa lor constînd în posibilitatea ca parametrii statistici

Scanned with OKEN Scanner

obţinuţi pe baza analizei modului de distribuire a amplitudinilor PPM să dea informaţii asupra mecanismului secretării veziculelor. S-a constatat astfel că distribuţia de tip Poisson nu este o regulă generală, în numeroase situaţii, cum ar fi plăcile motorii din muşchiul diafragm de şobolan (Christensen şi Martin, 1970) sau din muşchiul cozii de rac (Johnson şi Wernig, 1971; Zucker, 1973), numerele de cazuri n_x definite anterior fiind date de distribuţia binomială:

$$n_x = N \cdot C_n^x \cdot p^x \cdot (1 - p)^{n-x}.$$

În această formulă N şi x au aceleaşi semnificaţii ca mai sus, p este probabilitatea ca fiecare cuantă de mediator să fie secretată ca răspuns la un stimul nervos, iar n este numărul total de cuante ce pot fi secretate. În mod evident, deci, numărul mediu de cuante secretate pentru un impuls este: $\mu = p \cdot n$. Coeficientul C_n^x este numărul de combinări de n obiecte (cuantele sau veziculele cu mediator) luate cîte x*.

Semnificaţia structurală şi funcţională a parametrilor statistici n şi p pare a fi următoarea: n este o măsură a numărului de locuri din care pot fi eliberate cuantele de mediator al căror efect pe membrana postsinaptică îl detectează un singur microelectrod extracelular, acest număr de locuri de secreţie fiind factorul care limitează numărul de cuante ce pot fi secretate; p este probabilitatea ca fiecare loc de secreţie să elibereze o cuantă de mediator chimic.

V.2.5. Difuzia mediatorului chimic

Mediatorul chimic eliberat prin spargerea veziculelor trebuie să parcurgă spaţiul sinaptic, deci o distanţă de aproximativ 200 A pentru a ajunge în contact cu receptorul specific de pe membrana postsinaptică. Faptul că ACh poate fi colectată în fluidul de perfuzie al unui preparat neuromuscular izolat — aşa cum au arătat experienţele clasice ale lui Loewi şi Cannon — ca şi rapiditatea efectului ei excitator atunci cînd este aplicată din exterior în vecinătatea membranei postjoncţionale arată că AcCh nu este legată de macromolecule în spaţiul sinaptic, ci difuzează liber.

* Distribuţia Poisson se numeşte „legea evenimentelor rare", deoarece este un caz limită al distribuţiei binomiale pentru situaţia cînd n este foarte mare şi p foarte mic.

Katz şi Miledi (1965), considerînd că faza de creştere a mPPM exprimă creşterea concentraţiei de AcCh ajunsă în contact cu receptorii postsinaptici, au estimat timpul de parcurgere a spaţiului sinaptic de către moleculele de mediator ca fiind de ordinul a 0,1 ms. Întîrzierea sinaptică, în jur de 0,75 ms la muşchiul de broască este deci numai parţial datorată acestei difuzii, în mod mai semnificativ contribuind însuşi procesul de secreţie a mediatorului.

Alături de hidroliza de către AChE, la înlăturarea moleculelor de AcCh în afara spaţiului sinaptic contribuie foarte eficient şi simplul proces de difuzie. Astfel, Ogston (1955) a arătat că în condiţiile în care AChE este inhibată, deci nu mai poate hidroliza AcCh, toată cantitatea de mediator eliberată prin stimularea nervului dispare în cîteva milisecunde din spaţiul sinaptic difuzînd în exterior.

V.2.6. Receptorul sinaptic de acetilcolină

Ipoteza că mediatorii chimici îşi exercită efectul asupra celulelor postjoncţionale în urma legării de anumite substanţe cu rol de receptor situate pe membrana acestor celule îşi are originea în observaţiile lui Langley referitoare la efectele antagoniste competitive ale curarei şi nicotinei.

Natura receptorului sinaptic a rămas obscură pînă în ultimii ani, toate datele mai vechi fiind exclusiv de factură farmacologică. Astfel, faptul că diferiţi compuşi cuaternari de amoniu, printre care şi AcCh, depolarizează membrana postjoncţională mărindu-i permeabilitatea ionică a fost interpretat ca dovada producerii unei tranziţii conformaţionale în moleculele receptoare, această interpretare fiind însă doar indirectă, fără vreo dovadă fizico-chimică nemijlocită. De asemenea, efectul inhibitor al unor compuşi ca d-tubocurarina şi ionul de tetraetilamoniu a fost atribuit combinării cu receptorii de AcCh, combinare în urma căreia nu se produce vreo modificare de permeabilitate, dar este împiedicată ataşarea pe receptor a mediatorilor chimici.

Localizarea receptorilor pe membrana celulelor postsinaptice a fost posibilă prin utilizarea tehnicii de *iontoforeză* (sau ionoforeză) elaborată de N. Nastuk în 1953 (Nastuk, 1974). În esenţă, această tehnică, a cărei schemă de principiu este redată în fig. V.10, constă din eliberarea de mediator chimic (AcCh) sau a unei substanţe cu acelaşi

efect (carbacol etc.) din vîrful unei micropipete de tipul celor din care se fac microelectrozii, datorită faptului că AcCh este sub formă de cationi şi deci un anumit puls de curent va determina ieşirea electroforetică a unui număr fix de ioni $AcCh^+$. Del Castillo şi Katz au arătat în 1955 că porţiunea fibrei musculare din imediata vecinătate a terminaţiilor nervoase este extrem de sensibilă la mediatorul chimic, pentru producerea unei depolarizări de cîţiva mV fiind suficientă o cantitate de 10^{-16} mol de AcCh, însă chiar zonele imediat învecinate sînt mult mai puţin sensibile.

Introducerea micropipetei în interiorul celulei postsinaptice şi eliberarea mediatorului în vecinătatea feţei interne a membranei postsinaptice nu produce vreun efect, ceea ce arată că receptorii de mediator sinaptic sînt localizaţi pe faţa externă a membranei. Cercetările ulterioare (Katz şi Miledi, 1964) au confirmat distribuirea neuniformă a receptorilor pe suprafaţa fibrelor musculare, ei fiind concentraţi în zona joncţiunii neuromusculare, dar existînd şi în afara acestei zone.

Deoarece membranele postsinaptice conţin multă AChE, s-a sugerat că atît AChE, cît şi receptorul ar fi porţiuni diferite din aceeaşi macromoleculă (Changeux şi colab., 1969), ceea ce pare însă puţin probabil date fiind comportările lor diferite. Astfel, constantele de disociere ale com-

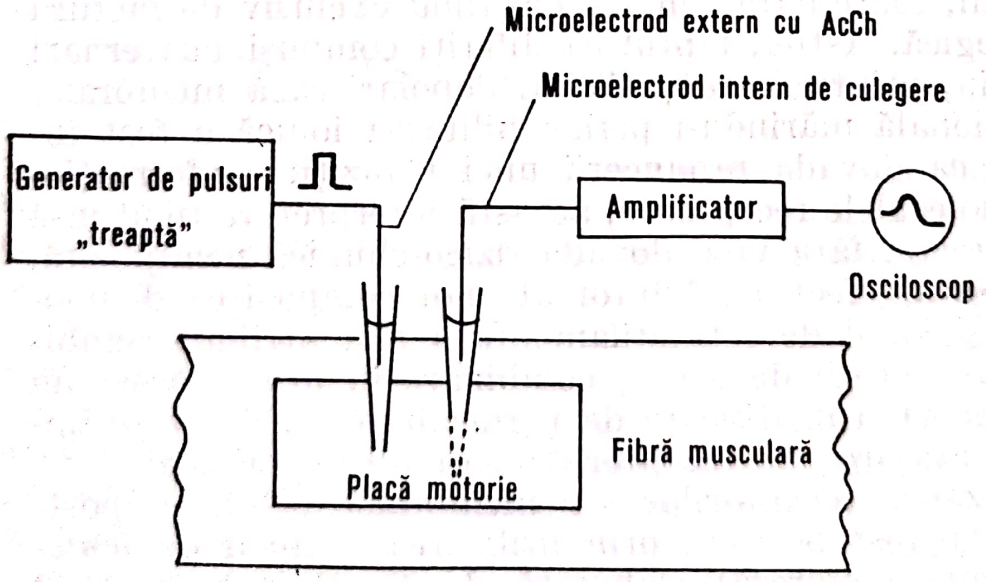


Fig. V.10. : Schema de principiu a instalaţiei de iontoforeză. Micropipeta din care pulsul de curent produce ieşirea unei cantităţi fixe de AcCh şi aceea prin care se culege intracelular potenţialul plăcii motorii sînt distanţate la 10—20 μ m.

plexelor AcCh cu receptorul şi cu AChE sînt foarte diferite şi o serie de enzime proteolitice care inactivează AChE nu afectează proprietăţile receptorului.

Identificarea şi extragerea selectivă a receptorului acetilcolinei a devenit posibilă după ce s-a descoperit că anumite toxine din veninurile unor şerpi din Extremul Orient se leagă selectiv şi ireversibil de acest receptor. Astfel sînt α-bungarotoxina (extrasă din veninul şarpelui *Bungarus multicinctus*) şi α-neurotoxina (extrasă din *Naja nigricolis*). Aceste toxine abolesc ireversibil efectul AcCh asupra membranelor postsinaptice, fără a afecta însă potenţialele de repaus şi de acţiune ale celulelor postsinaptice (Chang şi Lee, 1963; 1966). Receptorii de acetilcolină se pot identifica şi izola sub forma complexelor lor cu α-bungarotoxina marcată de exemplu cu iod radioactiv (Raftery, 1973) sau a complexelor cu α-neurotoxina tritiată (Weber şi Changeux, 1974 a; b; c).

De Robertis (1971) a reuşit să extragă din membranele electroplăcilor (din organul electric al peştelui *Electrophorus*) iar apoi să purifice o proteină hidrofobă (proteolipid) ce leagă cu afinitate mare AcCh şi alte substanţe colinergice, comportîndu-se deci ca receptor al mediatorului sinaptic. Acest proteolipid a putut fi extras şi din membrane de pe care AChE a fost îndepărtată, dovedindu-se astfel direct că enzima şi receptorul sînt două macromolecule diferite, (De Robertis şi Fiszer de Plazas, 1970). Introducînd acest receptor ipotetic în filme lipidice bimoleculare (în proporţie de 1/10 000), rezistenţa electrică a acestora scade considerabil. Adăugînd apoi AcCh se produce o nouă creştere considerabilă de conductanţă, care este tranzitorie în timp şi pe care d-tubocurarina o inhibă. Similitudinea acestor variaţii de conductanţă, şi deci de permeabilitate, cu comportarea *in vivo* a membranei postsinaptice este evidentă.

Pe baza proprietăţilor acestui proteolipid, De Robertis (1972; 1975) a elaborat modelul de receptor colinergic redat în fig. V.11.

Conform acestui model, în membrana postsinaptică sînt zone distincte de localizare a moleculelor proteolipidice receptoare. Avînd caracter hidrofob şi formă alungită, aceste molecule traversează stratul lipidic al membranei dintr-o parte în alta, comportîndu-se deci ca proteine „intrinseci" în cadrul imaginii „în mozaic" a membranei (§ II.1.1). Ele au o dispunere tetramerică, fiecare unitate avînd masa de

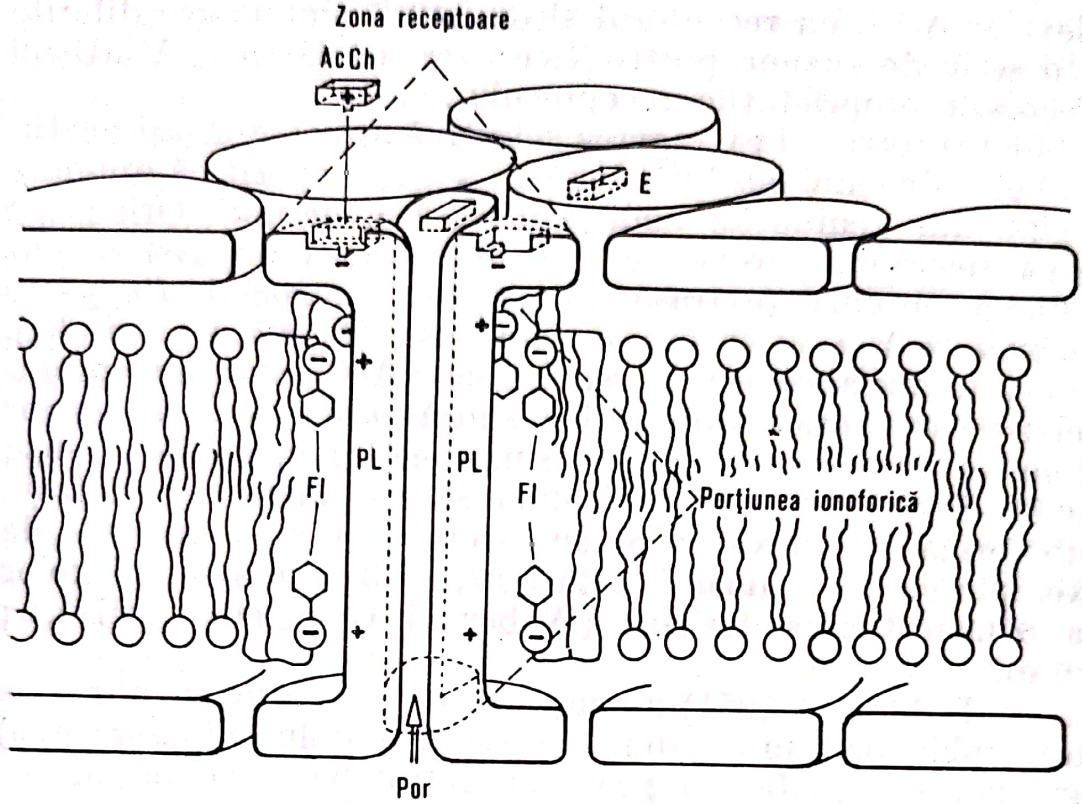


Fig. V.11. : Diagrama lui De Robertis (1971) privind organizarea macromoleculară a membranei postsinaptice în zona receptorului de acetilcolină (AcCh). Membrana este traversată de patru molecule proteolitice (*PL*) ale căror porțiuni ionoforice constituie canalul pe care îl deschide atașarea AcCh. *E* este acetilcolinesteraza avînd și ea un loc receptor pentru AcCh. Este arătată, de asemenea, atașarea de proteolipidele canalului a unor molecule de fosfatidil-inozitol (*FI*).

aproximativ 80 000 u. Cele patru unități monomerice formează un por care în condiții de repaus este închis într-un anumit punct, astfel că ionii nu pot trece. Legarea mediatorului chimic (AcCh) pe locurile receptoare de pe suprafața externă a membranei schimbă interacția dintre unitățile monomerice, rezultatul fiind deschiderea porului. Acetilcolinesteraza este o moleculă diferită de receptor, situată în vecinătatea acestuia.

Efectul diferiților agenți farmacologici care influențează sinapsele și în particular al toxinelor poate fi ușor înțeles pe baza imaginii prezentate mai sus. Astfel, α-bungarotoxina, ca și d-tubocurarina ocupă și inhibă locul de recunoaștere a acetilcolinei. Histrionicotoxina (extrasă din secreția glandelor epidermice ale broaștei sud-americane *Dendrobates histrionicus*) nu interacționează cu locurile de recunoaștere ale mediatorului, dar astupă direct porul.

Acest tip de model, încă perfectibil, are meritul de a oferi o imagine coerentă pe baza căreia să poată fi înţelese mecanismele moleculare ale funcţionării membranelor postsinaptice. Diferite elaborări teoretice ale cineticii procesului de creştere a permeabilităţii membranei ca urmare a legării mediatorului pe receptor (Kordaš, 1972; Levy şi colab., 1976) se bazează în mod explicit sau cel puţin implicit pe o astfel de imagine.

V.3. POTENŢIALELE POSTSINAPTICE LOCALE

Mediatorul chimic produce, ca urmare a ataşării sale de receptorii de pe membrana postsinaptică, o variaţie locală şi tranzitorie a potenţialului de membrană, această variaţie constituind potenţialul postsinaptic sau postjoncţional care în cazul celulelor musculare este PPM. Variaţiile de potenţial ale membranei postsinaptice induse de legarea mediatorului chimic pe receptorii specializaţi de pe aceasta se produc datorită modificărilor de permeabilitate ale membranei pentru diferiţi ioni.

În stare de repaus, diferenţa de potenţial E între interiorul celulei postjoncţionale şi spaţiul sinaptic este dată, ca pentru orice celulă, de formula lui Goldman (§ II.2.2. şi II.4):

$$E = (g_K E_K + g_{Na} E_{Na} + g_{Cl} E_{Cl})/(g_K + g_{Na} + g_{Cl}),$$

în care cu g_i sînt notate conductanţele membranei pentru fiecare din cei trei ioni K^+, Na^+ şi Cl^- (conductanţele fiind proporţionale cu permeabilităţile), iar cu E_i — potenţialele de echilibru electrochimic ale fiecăruia din aceşti ioni. E_K are valori în jur de -100 mV iar E_{Na} — în jur de $+50$ mV. Deoarece conductanţa membranelor celulare pentru potasiu este mult mai mare decît pentru sodiu, potenţialul de repaus are valori mai apropiate de E_K, fiind în jur de -70 mV.

Dacă efectul mediatorului chimic este de a deschide canalele prin care trece un anumit tip de ioni, deci de a creşte conductanţa membranei faţă de aceştia, el va face ca potenţialul de membrană E să se apropie de potenţialul de echilibru electrochimic al respectivilor ioni. Cînd membrana este permeabilizată pentru ionii Na^+, variaţia de potenţial va însemna o reducere a valorii negative a E, deci o depo-

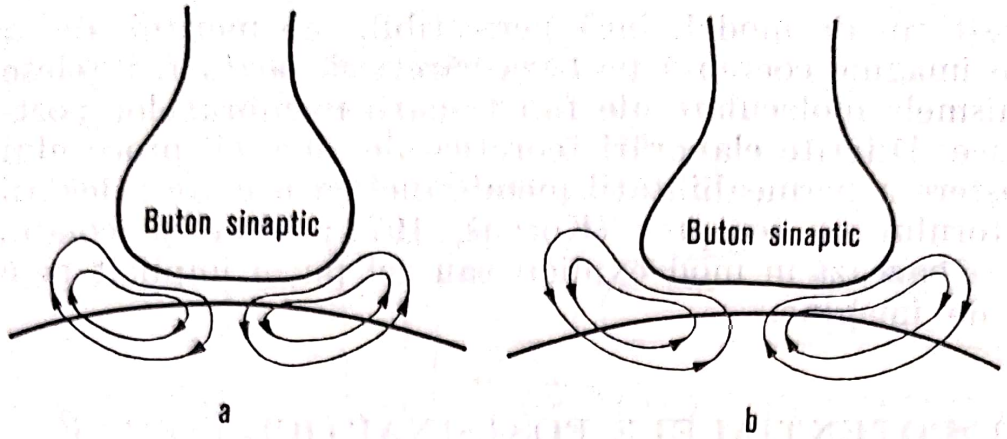


Fig. V.12. : Sensul curenţilor electrici prin membrana postsinaptică în cazul sinapselor excitatoare (*a*) şi inhibitoare (*b*).

larizare. În acest caz, potenţialul postsinaptic este excitator, iar atunci cînd depăşeşte valoarea de prag, va produce un potenţial de acţiune în celula postsinaptică. În cazul particular al plăcilor motorii, PPM este întotdeauna excitator. Dacă însă mediatorul chimic determină permeabilizarea membranei pentru K^+, variaţia de potenţial va fi o hiperpolarizare şi deci potenţialul postsinaptic va fi inhibitor. În fig. V.12 este arătat sensul de străbatere a membranei postsinaptice de către curenţii ionici apăruţi ca urmare a creşterii selective a permeabilităţii ei sub influenţa mediatorului chimic.

Dacă mediatorul chimic deschide canale din membrana postsinaptică ce nu sînt perfect selective, prin ele putînd trece mai multe specii ionice, potenţialul de membrană, numit *potenţial de echilibru al mediatorului*, nu va fi identic cu potenţialul de echilibru electrochimic al vreunui ion. Valoarea acestui potenţial este cel mai important parametru experimental pentru caracterizarea modificărilor produse în membrana postsinaptică sub influenţa mediatorului. În cazul muşchilor striaţi AcCh determină creşterea conductanţei membranei postsinaptice nu numai pentru Na^+, ci şi pentru K^+ (şi chiar pentru alţi ioni), dar în astfel de proporţii încît potenţialul de echilibru al mediatorului este excitator, avînd valori în jur de -20 mV.

Valoarea potenţialului de echilibru al mediatorului poate fi determinată experimental introducînd în aceeaşi celulă postsinaptică doi microelectrozi : unul care indică diferenţa de potenţial faţă de soluţia externă şi un altul prin care se poate injecta un astfel de curent încît diferenţa de potenţial citită

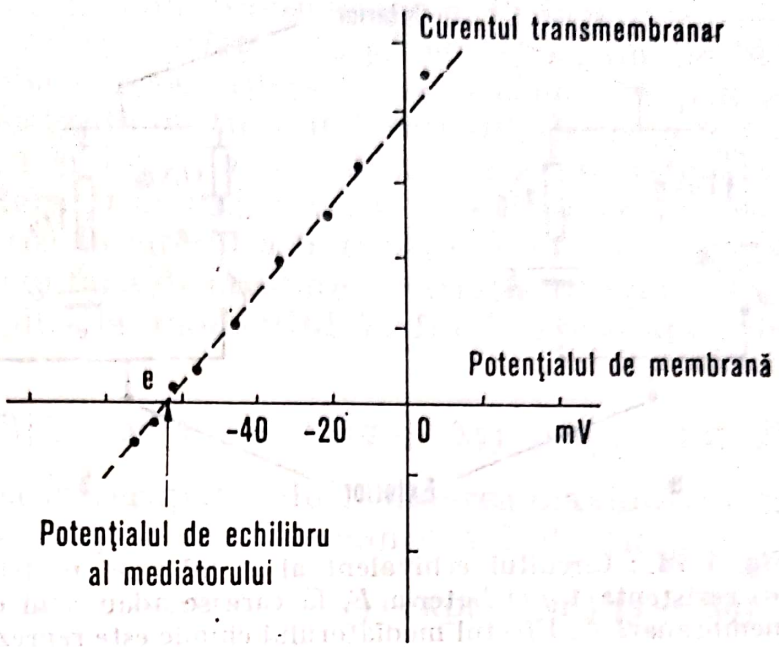


Fig. V.13. : Reprezentare a curentului prin membrana postsinaptică în funcţie de potenţialul de membrană, pentru a ilustra modalitatea de obţinere a potenţialului de echilibru al mediatorului.

de primul să aibă o valoare fixă. Dacă se trasează un grafic al curentului în funcţie de diferenţa de potenţial (fig. V.13), potenţialul de echilibru al mediatorului — notat cu e — este valoarea potenţialului de membrană E pentru care curentul este nul.

Pentru a putea înţelege forma şi amplitudinea variaţiei de conductanţă Δg a membranei postsinaptice sub influenţa mediatorului chimic, în fig. V.14 c este înfăţişat un circuit echivalent în care bateria E reprezintă potenţialul transmembranar în repaus, g este conductanţa globală a membranei în repaus, iar efectul mediatorului de deschidere a unor noi canale ionice este reprezentat prin întrerupătorul care introduce în paralel în circuit conductanţa Δg şi o baterie de valoarea potenţialului de echilibru al mediatorului, e, (Ginsborg, 1973).

În repaus, cînd în circuit sînt numai bateria E şi rezistenţa $1/g$, diferenţa de potenţial între interior şi exterior este :

$$V = E + I/g,$$

dacă circulă un curent constant I prin membrană. În mod evident, în starea staţionară de repaus, fluxurile ionice pasive

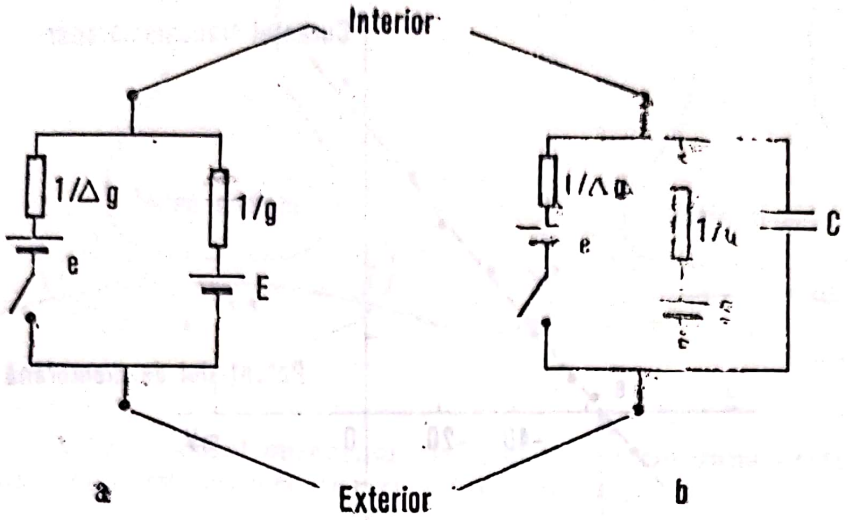


Fig. V.14. : Circuitul echivalent al membranei postsinaptice, constînd din : (*a*) rezistenţa $1/g$ şi bateria E, la care se adaugă în cazul (*b*) şi capacitatea membranară C. Efectul mediatorului chimic este reprezentat prin introducerea în paralel a rezistenţei $1/\Delta g$ şi a bateriei e.

care circulă prin membrană într-un sens sînt compensate de fluxuri active în sens invers, astfel încît curentul electric net este nul ($I = 0$) şi deci : $V = E$.

Introducerea în circuit şi a bateriei e şi a rezistenţei $1/\Delta g$ face ca diferenţa de potenţial să fie :

$$V' = (gE + \Delta g\, e + I)/(g + \Delta g).$$

Efectul mediatorului este de a produce o variaţie de potenţial :

$$\Delta V = V' - V = \Delta g(e - V)/(g + \Delta g).$$

Faţă de starea normală de repaus în care $V = E$:

$$\Delta V = \Delta g(e - E)/(g + \Delta g).$$

Dacă efectul de permeabilizare a membranei de către mediatorul chimic echivalează cu introducerea în paralel a unei conductanţe Δg egală cu dublul conductanţei de repaus g şi dacă $E = -70$ mV, iar potenţialul de echilibru al mediatorului este $e = -20$ mV, variaţia de potenţial ΔV, adică amplitudinea PPM în cazul muşchiului, va fi $\Delta V = 33$ mV. Efectul mediatorului este în acest caz de a depolariza membrana cu 33 mV, fiind deci excitator şi putînd induce apariţia unui potenţial de acţiune.

Pe baza circuitului din fig. V.14 b se poate înţelege şi variaţia în timp a potenţialului postsinaptic. Prezenţa capacităţii membranei face ca variaţia de potenţial să nu fie instantanee, ci să aibă o fază exponenţială ascendentă şi una descendentă cu constante de timp determinate de caracteristicile circuitului cu şi fără Δg. Dacă acţiunea mediatorului chimic de deschidere tranzitorie a canalelor ionice echivalează cu introducerea în circuit a bateriei e şi a conductanţei Δg un timp T, atunci faza de creştere a variaţiei de potenţial va dura cel mult pînă la momentul T, fiind exprimată prin relaţia :

$$\Delta V(t) = \Delta g(e - E)[1 - \exp(-t/\tau)]/(g + \Delta g) \text{ pentru } t \leqslant T.$$

După redeschiderea întrerupătorului, valoarea maximă atinsă $\Delta V(T)$ scade exponenţial cu altă constantă de timp :

$$\Delta V(t) = \Delta g(e - E)\,[1 - \exp(-T/\tau)]\exp(-t/\tau')/(g + \Delta g)$$
$$\text{pentru } t > T.$$

Constantele de timp τ şi τ' corespund respectiv circuitului în care este şi conductanţa Δg, iar apoi fără aceasta, adică :

$$\tau = C/(g + \Delta g) \quad \text{şi} \quad \tau' = C/g.$$

Dacă amplitudinea potenţialului postsinaptic depăşeşte valoarea pragului de excitaţie, în celula postsinaptică se va declanşa un potenţial de acţiune. Dacă nu depăşeşte pragul sau dacă este inhibitor, potenţialul postsinaptic local se va însuma cu alte variaţii locale de potenţial provenind de la alte terminaţii nervoase, efectul global depinzînd de amplitudinea rezultantă. Pe baza circuitului din fig. V.14 b este evident faptul că potenţialele postsinaptice se însumează algebric atît în timp, cît şi în spaţiu, acest fenomen reprezentînd baza biofizică a funcţiei de integrare pe care o au sinapsele.

V.3.1. Caracteristicile canalului ionic pe care îl deschide ACh în membrana postsinaptică a plăcii motorii

Reprezentarea membranei postsinaptice prin circuite echivalente de tipul arătat în fig. V.14 permite înţelegerea potenţialelor joncţionale produse de mediatorii sinaptici în

cadrul aceluiaşi sistem de concepte pe care teoria ionică le-a introdus pentru a descrie propagarea potenţialului de acţiune, rămînînd totuşi numai la nivelul fenomenologiei globale a proceselor.

Măsurarea de către Takeuchi şi Takeuchi (1960) a variaţiei de conductanţă şi a pulsului de curent ionic asociate cu minipotenţialele spontane date de spargerea unei singure vezicule cu AcCh, corelată cu estimarea numărului de molecule de AcCh dintr-o veziculă permite calcularea caracteristicilor electrice ale canalelor ionice pe care le deschide mediatorul chimic în membrana postsinaptică. Astfel, un mPPM de amplitudine minimă se asociază cu o creştere locală a conductanţei membranei cu aproximativ $10^{-7}\Omega^{-1}$, timp de 1 ms în care în fibra musculară intră un curent de aproximativ 10^{-8} A. Luînd ca ordin de mărime al numărului de molecule de AcCh conţinute într-o veziculă 10^4, rezultă că la nivelul fiecărui receptor de pe membrana postsinaptică este o creştere a conductanţei de $10^{-11}\Omega^{-1}$ şi trece un curent de 10^{-12} A. Aceste estimări sînt însă în mod evident foarte indirecte.

În ultimii ani Katz şi Miledi (1971 ; 1972) au putut obţine o descriere mai directă a funcţionării canalelor ionice deschise tranzitoriu de AcCh, aplicînd la studiul membranei postjoncţionale noua abordare biofizică a analizării *zgomotului electric* al membranei.

În sens general, prin zgomot se înţelege manifestarea fizică a oricărui fenomen aleatoriu, fluctuant. Înseşi potenţialele miniaturale (mPPM) constituie un astfel de zgomot la nivel subcelular, exprimînd din punct de vedere electric spargerea aleatorie a veziculelor care conţin mediator. B. Katz şi R. Miledi au reuşit să treacă la analiza zgomotului de nivel molecular exprimat de fluctuaţiile pe care le are potenţialul membranei postsinaptice în condiţiile unei concentraţii constante de AcCh, ca urmare a fluctuaţiilor statistice ale proceselor de ciocnire între moleculele de AcCh şi receptorii membranari şi de formare a complexelor care fac ca respectivele canale membranare să fie deschise.

Un microelectrod plasat intracelular în zona plăcii motorii înregistrează, în afara fenomenelor bioelectrice de tipul mPPM, şi un anumit zgomot (fig. V.15 a) rezultat din diferite cauze, cum ar fi : deplasări mecanice infime ale electrodului, zgomotul electronic al aparaturii etc., întotdeauna căutîndu-se eliminarea la maximum a acestor cauze. Apli-

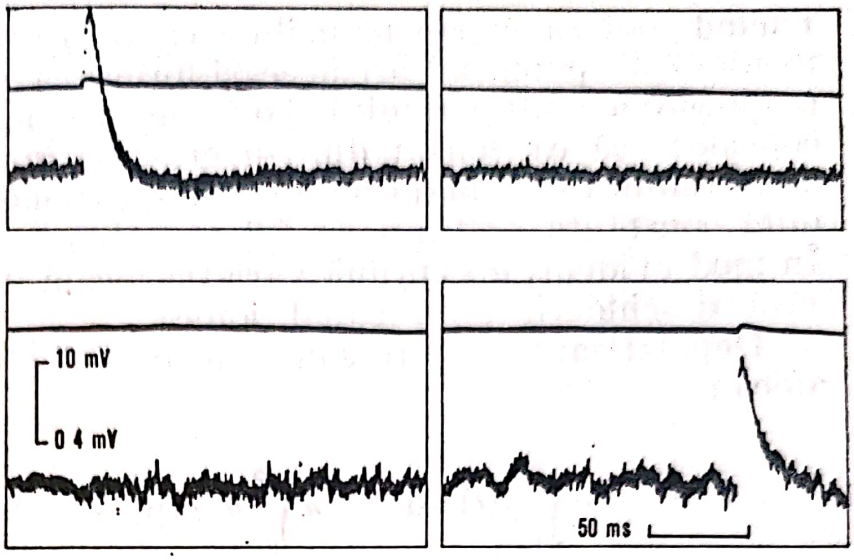


Fig. V.15. (după Katz și Miledi, 1972): Creșterea zgomotului de fond al potențialului postsinaptic atunci cînd se aplică o doză constantă de ACh (*b*), față de normal (*a*). În toate înregistrările traseul de jos pe care se poate observa zgomotul corespunde amplificării mai mari în care bara verticală reprezintă 0,4 mV, iar traseul de sus corespunde amplificării mai mici. În prima și ultima înregistrare apare și cîte un *mPPM* spontan.

carea în soluția de imersie a mușchiului a unei concentrații de AcCh suficient de mică pentru a nu produce excitarea duce nu numai la o anumită depolarizare constantă, dar și la o accentuare a zgomotului (fig. V.15 b), datorită fluctuațiilor canalelor deschise de către AcCh. Acest zgomot suplimentar nu apare atunci cînd depolarizări similare sînt produse altfel decît prin AcCh și nu depinde de modalitatea de aplicare a acetilcolinei (în baie sau în vecinătatea mușchiului, cu o pipetă mai apropiată sau mai îndepărtată), ceea ce arată clar că este asociat cu interacția moleculară dintre mediatorul chimic și membrană.

După înregistrare, zgomotul electric al membranei postjoncționale poate fi analizat stabilindu-se amplitudinea și distribuția diferitelor frecvențe din care constă. Pe baza acestor parametri, Katz și Miledi (1972) au calculat că în cazul mușchiului de broască canalul ionic deschis de către AcCh are conductanța de $10^{-10}\Omega^{-1}$, prin el trecînd timp de 1 ms un curent de 10^{-11} A, adică o sarcină echivalentă cu $5 \cdot 10^4$ cationi monovalenți.

Depolarizarea V produsă de AcCh rezultă din însumarea unor efecte elementare identice între ele, fiecare apărînd la intervale de timp aleatorii cu o frecvență medie n și avînd o aceeași evoluție în timp dată de o anumită funcție $f(t)$.

Făcînd ipoteza foarte plauzibilă că respectiva variaţie elementară de potenţial are aceeaşi formă ca şi mPPM, dar o amplitudine mult mai mică şi o rapiditate mai mare, se poate considera că ea constă dintr-o creştere instantanee pînă la amplitudinea a, urmată de o scădere exponenţială cu o anumită constantă de timp τ : $f(t) = a \cdot \exp(-t/\tau)$.
În mod evident, a exprimă variaţia locală de potenţial datorată deschiderii unui canal ionic.

Depolarizarea V este suma tuturor efectelor elementare, adică :

$$V = n\int_0^\infty f(t) \cdot \mathrm{d}t = n\int_0^\infty a \exp(-t/\tau)\,\mathrm{d}t = na\tau.$$

Amplitudinea zgomotului este abaterea pătratică medie a zgomotului :

$$\overline{E^2} = n\int_0^\infty f^2(t) \cdot \mathrm{d}t = na^2\tau/2.$$

Rezultă, deci, că : $a = 2\,\overline{E^2}/V$, adică parametrul a poate fi calculat măsurînd depolarizarea V produsă de respectiva concentraţie de AcCh şi amplitudinea zgomotului. În acest mod s-a găsit $a \approx 0{,}3\ \mu V$ şi s-au calculat datele menţionate anterior.

Raportul de aproximativ 10^3 între amplitudinea mPPM şi variaţia locală de potenţial datorată deschiderii unui singur canal sugerează că aproximativ 1000 de canale ionice sînt deschise de către o cuantă de mediator, ceea ce ar implica un număr de 4000 molecule de AcCh într-o veziculă, admiţînd că pentru deschiderea unui canal sînt necesare 4 molecule de AcCh.

Diferenţa de un ordin de mărime între estimarea conţinutului unei vezicule pe cale chimică şi prin intermediul zgomotului electric molecular al deschiderii canalelor ionice se poate datora necunoaşterii fie a proporţiei de molecule de mediator care ajung efectiv să interacţioneze cu mediatorul, fie a probabilităţii de a deschide canalele etc. Importanţa deosebită a studiilor referitoare la zgomotul electric al membranei postsinaptice constă tocmai în perspectivele pe care le oferă de a obţine date despre acest gen de parametri ai mecanismelor de nivel molecular ale transmisiei sinaptice.

V.3.2. Fenomenele fizico-chimice de la nivelul membranei postsinaptice

Ca şi în cazul fenomenelor care au loc în celula presinaptică atunci cînd sînt eliberate veziculele cu mediator, şi procesele prin care acest mediator induce variaţii specifice de conductanţă în membrana postsinaptică sînt descrise satisfăcător din punct de vedere fenomenologic (electric), dar insuficient înţelese în ceea ce priveşte natura lor la nivel molecular. Pentru a ilustra caracterul foarte limitat al imaginii actuale asupra fenomenelor fizico-chimice din membrana postsinaptică, prezentăm pe scurt două modele referitoare la aceste fenomene, subliniind de la început caracterul lor în mare parte speculativ.

Dubois şi Schoffeniels (1975) au presupus că variaţia de conductanţă pe care AcCh o induce în membrana postsinaptică rezultă din „activarea" a doi ionofori, unul specific pentru cationii de sodiu, altul pentru potasiu, între activarea fiecăruia din aceşti ionofori fiind o anumită latenţă.

Ionoforul sodiului (R) este presupus a fi chiar receptorul de AcCh; prin legarea acesteia, R trece în configuraţia R′ căreia îi corespunde o conductanţă mare pentru sodiu:

$$\mathrm{AcCh} + \mathrm{R} \rightarrow \mathrm{R'AcCh} \rightarrow \mathrm{R'} + \mathrm{AcCh}.$$

Constanta de viteză a primului proces depinde de concentraţia de calciu existent în soluţie, iar a celui de-al doilea, de cîmpul electric transmembranar. Odată cu tranziţia R → → R′, crescînd conductanţa pentru sodiu, potenţialul membranei postsinaptice tinde să se apropie de potenţialul de echilibru electrochimic al sodiului.

Configuraţia ionoforului pentru potasiu (R_2) este determinată de ionii de calciu: atunci cînd ionoforul a legat calciul, conductanţa pentru potasiu este minimă, iar disociindu-se de calciu ionoforul trece într-o configuraţie R_2' cu mare conductanţă pentru potasiu:

$$\mathrm{R_2Ca} \rightarrow \mathrm{R_2'} + \mathrm{Ca}.$$

Prin simularea pe calculator a ecuaţiilor cinetice ale tranziţiilor celor doi ionofori, Dubois şi Schoffeniels au putut reproduce variaţiile de potenţial şi curenţii postsinaptici ceea ce desigur este un argument în favoarea unui ciclu de tranziţii în membrana postsinaptică.

În mod explicit, acest model atribuie apariţia potenţialului postsinaptic aceluiaşi tip de mecanism biochimic pe care autorii l-au presupus că este implicat şi în propagarea excitaţiei în membrana axonală (Dubois şi Schoffeniels, 1974) : două cicluri de transformări biochimice (ciclul acetilcolinei şi ciclul calciului) care determină conductanţele membranei pentru cei doi ioni principali (sodiul şi potasiul). Noţiunea de „ionofor" este folosită ca o denumire alternativă pentru „canalele ionice" (§ II.1.3), utilizarea ei implicînd însă punerea accentului nu pe aspectul structural de por, ci pe acela de moleculă cu proprietăţi ionofile specifice.

Meritul incontestabil al acestui model este de a propune o schemă plauzibilă pentru succesiunea de procese pe care AcCh le induce la nivelul membranei postsinaptice. Rămîne însă de demonstrat în ce măsură ipotezele de detaliu pe care se bazează scrierea ecuaţiilor care au fost simulate pe calculator corespund realităţii şi mai ales este îndoielnică identitatea dintre mecanismul apariţiei potenţialelor postsinaptice şi cel de propagare a potenţialelor de acţiune pe axon.

Wei (1968) a propus o explicaţie fizică a mecanismului transmisiei chimice sinaptice derivînd în parte din ideile care stau la baza modelului său de generare şi propagare a impulsului nervos (Wei, 1966 ; 1971). De fapt, el propune o interpretare fizică a generării de către AcCh a potenţialelor de acţiune în celula postsinaptică, fără a lua în considerare receptorii de AcCh şi canalele ionice pe care aceasta le-ar deschide în membrana postsinaptică.

Aşa cum s-a arătat în § III.6.3, premisa de bază a teoriei dipolare a impulsului nervos este că excitaţia se produce numai atunci cînd ansamblul forţelor care acţionează asupra ionilor N^+ îi fac să intre în interiorul fibrei, depăşind bariera de energie a stratului dipolar de la suprafaţa membranei. Existenţa acestui strat dipolar este presupusă datorită faptului că membrana are sarcini negative fixe la suprafaţă şi sarcini pozitive fixe în interior.

Avînd un capăt polar nitrogen şi un altul carboxil, molecula de AcCh este considerată un dipol cu lungimea de 10 Å, al cărui moment dipolar este de ordinul a $1{,}6 \cdot 10^{-28}$ C · m, adică produsul dintre lungimea dipolului şi sarcina electrică elementară. Cînd moleculele de AcCh sînt eliberate de terminaţiile nervoase în spaţiul sinaptic, orientările dipolilor sînt în general aleatorii. Wei presupune că, pe măsură ce vin în vecinătatea membranei postsinaptice, moleculele din primul

plan se orientează sub influenţa cîmpului electric al stratului dipolar al membranei, apoi acest strat îl orientează pe următorul etc., astfel încît AcCh s-ar dispune în spaţiul sinaptic în aranjamentul reprezentat în fig. V.16, formînd de fapt un „electret".

Acest „electret" acţionează asupra ionilor Na^+ din vecinătatea membranei postsinaptice, făcîndu-i să depăşească bariera de energie electrostatică şi să pătrundă în membrană, astfel excitînd celula postsinaptică. Pe baza acestui model, Wei a calculat diferiţi parametri caracteristici ai sinapselor, ca: lărgimea spaţiului sinaptic, întîrzierea sinaptică, intensitatea secreţiei de mediator chimic, obţinînd valori apropiate de cele măsurate experimental.

Cu toate acestea, mecanismul schiţat mai sus nu pare a fi mai mult decît o ipoteză interesantă şi coerentă cu ea însăşi, dar practic fără legătură cu realitatea fenomenelor la care se referă, datorită următoarelor motive:

— Valoarea momentului dipolar al AcCh este luată arbitrar, în realitate însuşi caracterul dipolar al moleculei fiind neglijabil faţă de comportarea ei de cation, datorită ionizării puternice a grupării aminice;

— Formarea spontană a unui „elèctret" de tipul reprezentat în fig. V.16 din dipolii de AcCh distribuiţi haotic

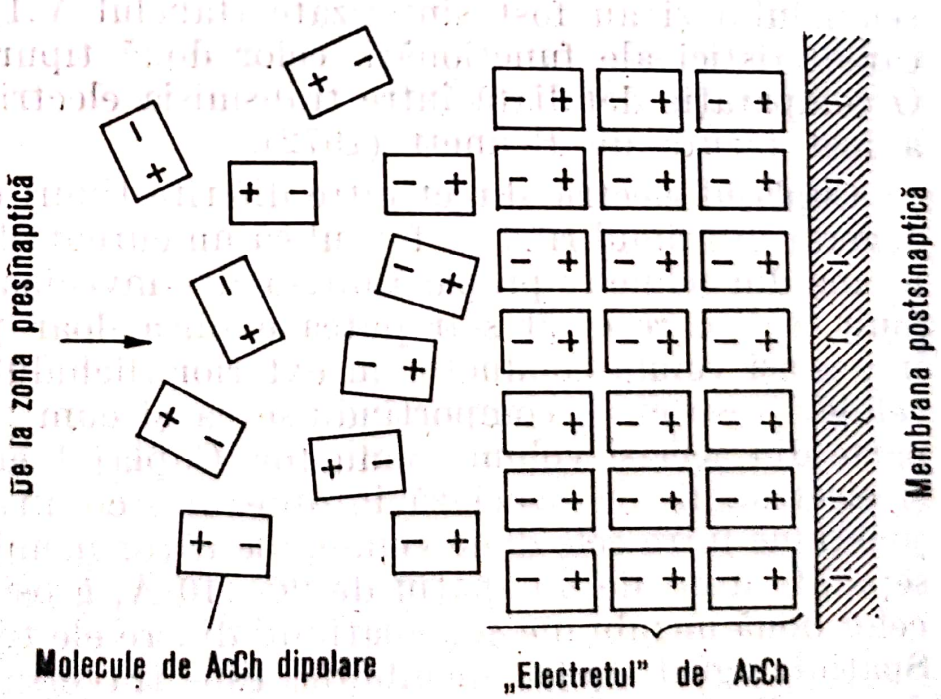


Fig. V.16.: Formarea treptată a unei dispuneri ordonate a dipolilor de AcCh în vecinătatea membranei postsinaptice, aşa cum presupune ipoteza lui Wei (1968).

este un fenomen extrem de improbabil datorită considerabilei scăderi de entropie pe care acest proces ar implica-o (Schmidt, 1973);

— Este ignorată specificitatea potenţialelor postsinaptice ca fenomene electrice locale distincte de potenţialul de acţiune şi nu se ia în considerare realitatea existenţei receptorilor specifici de AcCh şi a canalelor ionice pe care le deschide mediatorul în membrana postsinaptică.

Teoria dipolară a transmisiei sinaptice a apărut din necesitatea de a se înţelege mecanismul fizic al inducerii excitaţiei de către mediatorul chimic, dar un autentic răspuns la această problemă va fi probabil dat numai pe calea elucidării aprofundate a naturii tranziţiilor conformaţionale induse în ionoforii specifici din membrana postsinaptică.

V.4. SINAPSE CU TRANSMISIE ELECTRICĂ

În primul paragraf al acestui capitol au fost prezentate condiţiile în care transmisia unui semnal electric între două celule adiacente se poate face numai prin intermediul unui agent chimic ce poate modifica proprietăţile membranei celulare, precum şi posibilitatea unei transmisii directe a semnalului şi au fost sintetizate (tabelul V.1) principalele caracteristici ale funcţionării celor două tipuri de sinapse. O comparaţie detaliată între transmisia electrică şi chimică a fost făcută de Bennett (1972).

Cuplajul electric direct între diferite tipuri de celule este sugerat în primul rînd de faptul că un curent electric aplicat în una din celule se propagă într-o alta învecinată în măsură mult mai mare decît s-ar putea explica doar prin plasarea în acelaşi volum conductor în exterior (lichidul interstiţial), celulele respective comportîndu-se ca şi cum ar face efectiv parte din acelaşi volum conductor. Cuplajul electric, numit şi electrotonic, se asociază întotdeauna cu un anumit tip de joncţiune între cele două celule, ale căror membrane nu sînt separate decît de un spaţiu de 20—40 Å, grosimea totală a celor două membrane şi a spaţiului dintre ele fiind de 150 Å. Spaţiul îngust dintre membrane este traversat de o reţea de canalicule distribuite hexagonal care constituie contacte directe între citoplasmele celor două celule (Payton şi colab., 1969).

În mod evident, o joncţiune de acest tip prezintă la trecerea între cele două celule o impedanţă electrică mult mai mică faţă de contactul de la sinapsele chimice, permiţînd astfel o propagare eficientă a unui semnal electric.

Forma cea mai simplă şi mai puţin diferenţiată de sinapsă electrică este septul transversal care segmentează axonii giganţi din cordonul nervos longitudinal, al unor *Anelidae* şi *Crustaceae*. În fig. V.17 a este schematizată dispunerea microelectrozilor pentru trecerea curentului şi pentru înregistrarea potenţialului la joncţiunea septată a axonilor giganţi laterali ai racului (Watanabe şi Grundfest, 1961) iar în fig. V.17 b este repetată aceeaşi dispunere a microelectrozilor pentru studierea unei sinapse electrotonice oarecare.

Schema electrică echivalentă a contactului intercelular din fig. V.17 b este reprezentată în fig. V.18.

Atunci cînd de o parte a joncţiunii este aplicat un curent constant, se ajunge la valori constante ale potenţialului electric în fiecare din cele două celule. Prin definiţie, rezistenţele de intrare ale celulelor sînt date de raportul dintre potenţialul atins în respectiva celulă şi curentul care l-a produs :

$$r_{11} = V_1/i_1 \quad ; \quad r_{22} = V_2/i_2,$$

iar rezistenţele de transfer între celule sînt rapoartele dintre potenţialul atins în una din celule şi curentul aplicat în cealaltă :

$$r_{12} = V_2/i_1 \, ; \quad r_{21} = V_1/i_2 \, .$$

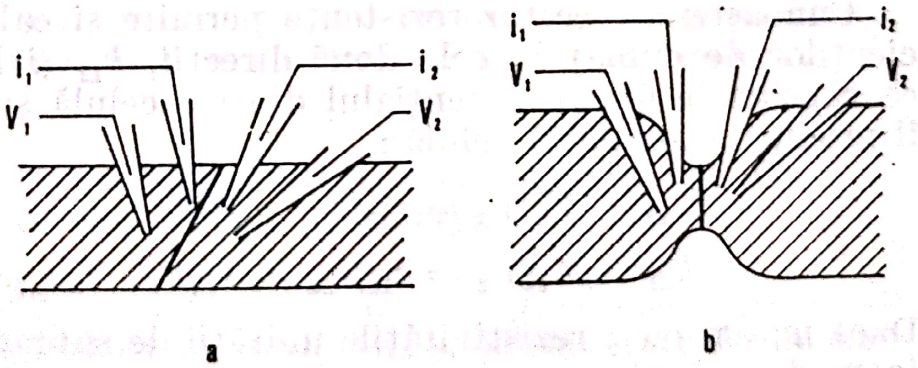


Fig. V.17. : Dispunerea microelectrozilor pentru trecerea curentului (i_1 ; i_2) şi pentru înregistrarea potenţialelor (V_1 ; V_2) la joncţiunea septată a axonilor giganţi ai racului (*a*) şi la o sinapsă electrotonică între două celule oarecare (*b*).

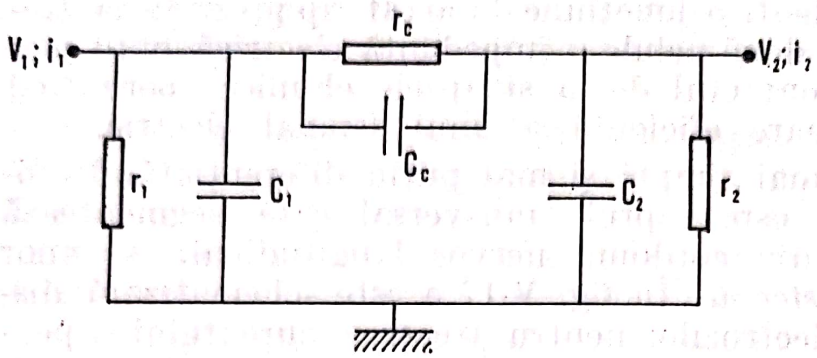


Fig. V.18. (după Bennett, 1966): Caracteristicile electrice ale unei sinapse cu transmisie directă, așa cum pot fi măsurate și calculate pe baza înregistrării curenților și potențialelor ca în fig. V.17. Cu r_c și C_c sînt notate, respectiv rezistența și capacitatea zonei de contact intercelular.

Pe baza schemei din fig. 19 și cu notațiile folosite acolo se pot exprima atît rezistențele de intrare, cît și cele de transfer în funcție de caracteristicile membranelor de la joncțiune:

$$r_{11} = r_1(r_c + r_2)/(r_1 + r_c + r_2)$$

$$r_{22} = r_2(r_1 + r_c)/(r_1 + r_c + r_2)$$

$$r_{12} = r_1 r_2/(r_1 + r_c + r_2) = r_{21},$$

rezistențele de transfer prin sinapsă în cele două sensuri fiind egale. În mod practic relațiile de mai sus sînt folosite invers, adică se determină experimental rezistențele de intrare și de transfer pe baza definițiilor lor și apoi se calculează cu relațiile de mai sus r_1, r_2 și r_c.

Cunoașterea acestor rezistențe permite și calculul coeficienților de cuplaj în cele două direcții, k_{12} și k_{21}, definiți ca rapoartele dintre potențialul dintr-o celulă și cel pe care îl produce în cealaltă celulă:

$$k_{12} = V_2/V_1 = r_{12}/r_{11} = 1/(1 + r_c/r_2)$$

$$k_{21} = V_1/V_2 = r_{12}/r_{22} = 1/(1 + r_c/r_1).$$

Dacă notăm cu ρ rezistivitățile unității de suprafață, atunci în mod evident:

$$k_{12} = \frac{1}{1 + \rho_c/\rho_2} \text{ și } k_{21} = \frac{1}{1 + \rho_c/\rho_1}.$$

Dacă rezistivitățile celor două membrane au valori apropiate $\rho_1 \approx \rho_2$, atunci și coeficienții de transfer sînt aproximativ egali: $k_{12} \approx k_{21}$, adică propagarea se face în ambele sensuri cu aceeași eficiență. Dacă însă: $\rho_1 \ll \rho_c \ll \rho_2$, atunci $k_{12} \approx 1$ și $k_{21} \approx 0$, adică propagarea se face unidirecțional. În majoritatea cazurilor sinapsele electrice se situează între aceste două situații extreme, propagarea fiind posibilă în ambele sensuri, în unul dintre ele fiind însă o atenuare mare.

Propagarea între cele două celule a semnalelor electrice variabile în timp, așa cum sînt potențialele de acțiune, este determinată în mod esențial de valorile capacităților din circuit (C_1, C_2 și C_c din fig. V.18), în funcție de acestea propagarea sinaptică fiind totuși cu o anumită latență (deși de regulă mult mai mică decît la sinapsele chimice) și putînd apărea și alte caracteristici, cum ar fi însumarea în timp a semnalelor.

Deoarece implică o latență mult mai mică decît transmisia chimică și poate fi bidirecțională, transmisia sinaptică prin cuplaj electric direct este modalitatea adecvată de interconectare între neuronii din același nucleu care trebuie să genereze impulsuri în mod sincron. Neuronul mai depolarizat tinde să le excite și pe celelalte fiind, pe de altă parte, inhibat de către acestea, astfel încît pragul de excitare este atins aproape simultan de tot ansamblul de neuroni din respectivul nucleu central.

Sinapsele electrice nu sînt în general adecvate pentru procesele de inhibiție în care potențialul postsinaptic trebuie să fie de sens invers celui presinaptic. De asemenea, nici fenomenele de „facilitare" și de „oboseală" (creșterea și respectiv scăderea eficienței transmisiei sinaptice ca rezultat al activității anterioare) nu sînt proprii sinapselor electrice, putînd însă apărea în unele condiții foarte particulare.

V.5. FUNCȚIA SINAPTICĂ, TIPURI DE SINAPSE ȘI DE MEDIATORI

Funcționarea celui mai complex și eficient sistem de recepție și prelucrare a informației și de elaborare a comenzilor efectorii se bazează, din motive de optimizare, pe semnale practic identice între ele — impulsurile nervoase —, dar implică, tocmai datorită complexității sale, realizarea unor operații foarte variate cu aceste semnale.

În mod evident, membrana excitabilă a fibrelor nervoase, funcţionînd după legea „tot sau nimic", este specializată pentru conducerea semnalelor, operaţiile de prelucrare făcîndu-se la nivelul membranelor somato-dendritice şi în modul cel mai evident la nivelul sinapselor. Aici poate avea loc conversia unei excitaţii a celulei presinaptice în inhibiţie a elementului postsinaptic, pe această bază apărînd *feedback*-ul în reţele de mai multe celule excitabile. Integrarea influenţelor venite în timp la o celulă de la diferite altele cu care este în contact se realizează la nivelul sinapselor prin însumarea spaţială a potenţialelor postsinaptice produse de mediatorii chimici eliberaţi de toate respectivele celule şi prin însumarea în timp a potenţialelor induse de o succesiune de stimuli din celula presinaptică. Coborîrea pragului de excitabilitate al celulei presinaptice în urma activităţii (fenomenul de „facilitare") şi respectiv creşterea sa („oboseala") permit definirea în timp a funcţiei sinaptice. Din combinarea acestor fenomene cu modificarea activităţii metabolice a neuronilor rezultă primele procese implicate în mecanismele complexe ale memoriei şi învăţării.

Multitudinea funcţiilor şi a cerinţelor fiziologice legate de transmisia sinaptică determină existenţa unei considerabile varietăţi de tipuri de sinapse. Sinapsele neuro-neuronale pot fi atît excitatorii, cît şi inhibitorii, iar mecanismul de funcţionare este cel mai adesea prin mediatori chimici, pentru a se asigura unidirecţionalitatea transmisiei, această unidirecţionalitate fiind baza ierarhizării etajelor de prelucrare a informaţiei. Atunci însă cînd primează cerinţa funcţionării sincrone a mai multor neuroni, sinapsele sînt cu transmisie electrică directă. Sinapsele neuro-efectorii, adică neuro-glandulare şi neuro-musculare, sînt şi ele atît excitatorii, cît şi inhibitorii, mecanismul de acţiune cel mai răspîndit, dar nu exclusiv, fiind cel chimic.

Principalele substanţe care acţionează ca mediatori la sinapsele periferice sînt acetilcolina (la plăcile motorii, în tot sistemul nervos parasimpatic şi parţial şi în sistemul nervos simpatic) şi norepinefrina (în porţiunile postganglionare ale sistemului nervos simpatic). În afară de acestea, o serie de alte substanţe acţionează ca mediatori chimici în sistemul nervos central: dopamina, serotonina, histamina şi diferiţi aminoacizi (glutamic, aspartic, γ-aminobutiric). Varietatea mediatorilor chimici răspunde, desigur, necesităţii de delimitare şi specificitate a diferitelor zone şi centri din

sistemul nervos al aceluiaşi organism sau exprimă diferenţe între specii, caracteristicile de bază ale transmisiei chimice sinaptice fiind aceleaşi, indiferent de natura mediatorului.

BIBLIOGRAFIE

A. Referinţe generale

BLOOM, F. E., IVERSEN, L. L., SCHMITT, F. O., ed. (1970), *Macromolecules in Synaptic Function*. „Neurosciences Res. Prog. Bull.", *8*, nr. 4.

ECCLES, J. C. (1964), *The Physiology of Synapses*, Academic Press, New York.

KATZ, B. (1966), *Nerve, Muscle and Synapse*, Mc-Graw Hill, New York.

KATZ, B. (1969), *The Release of Neural Transmitter Substances*, Liverpool Univ. Press, Liverpool.

MOUNTCASTLE, V. B., BALDESSARINI R. J. (1974), *Synaptic Transmission*, Cap. 6 în *Medical Physiology*, V. B. MOUNTCASTLE (ed.), C. V. Mosby, St. Louis.

NACHMANSOHN, D. (1960; 1974), *Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity*, Academic Press, New York.

NASTUK, W. L. (1974), *Neuromuscular Transmission*, Cap. 5 în *Medical Physiology*, V. B. MOUNTCASTLE (ed.), C. V. Mosby, St. Louis.

B. Referinţe speciale

AKERT, K., GRAY, E. G., BLOOM, F. E. (1970), „NRP Bull.", *8* (nr. 4), 336.

BASS, L., MOORE, W. J. (1966), „Proc. Nat. Acad. Sci. USA", *55*, 1214.

BENNETT, M. V. L. (1966), „Ann. N. Y. Acad. Sci.", *137*, 509.

BENNETT, M. V. L. (1972), în *Structure and Function of Synapses*, G. D. PAPPAS şi D. P. PURPURA (ed.), Raven Press, New York.

BENNETT, M. V. L. (1973), „Fed. Proc.", *32*, 65.

BIRKS, R., KATZ, B., MILEDI, R. (1960), „J. Physiol.", *150*, 145.

BODIAN, D. (1972), „Anat. Rec." *174*, 73.

BOYD, I. A., MARTIN, A. R. (1956), „J. Physiol.", *132*, 74.

BRIGHTMAN, M. W., REESE, T. S. (1969), „J. Cell. Biol.", 40, 648.

BROOKS, V. B. (1956), „J. Physiol.", *134*, 264.

CHANG, C. C., LEE, C. Y. (1963), „Arch. Intern. Pharmacodyn.", *144*, 241.

CHANG, C. C., LEE, C. Y. (1966), „Brit. J. Pharmacol. Chemotherap.", 28, 172.

CHANGEUX, J. -P., PODLESKI, T. R., MEUNIER, J. C. (1969), „J. Gen. Physiol.", *54*, 225.

CAPITOLUL VI

BIOFIZICA FUNCȚIONĂRII CELULELOR RECEPTOARE

Organismele vii, cel mai adesea reprezentînd structuri extrem de complexe, pot exista numai în cadrul unor domenii bine definite de valori ale parametrilor caracteristici ai mediului ambiant. Pe de altă parte, este necesară o permanentă coordonare a funcționării subsistemelor componente ale respectivului organism, ca și integrarea vieții acestuia în sistemele biologice de nivel supraindividual din care face parte. Aceste două cerințe impun să existe fluxuri continue de informație, atît între organisme și mediu, cît și în interiorul organismelor.

Organismele obțin informații despre caracteristicile mediului extern și despre starea de funcționare a diferitelor subsisteme componente (organe etc.) prin intermediul *analizatorilor*. Noțiunea de analizator — ilustrare a concepției cibernetice în biologie — exprimă ansamblul complex de recepție și prelucrare a informației senzoriale, constînd dintr-un sistem de recepție și mai multe etaje de prelucrare, ansamblu ce permite să se obțină datele necesare elaborării comenzilor de dirijare a elementelor efectoare (mușchi, glande) sau care servesc activității nervoase superioare. Toată informația prelucrată în sistemul nervos provine inițial din acțiunea exercitată asupra unor celule specializate pentru detecție — *receptorii* (numiți și *celule senzitive* sau *senzoriale*) — de către *stimuli*, adică factori fizico-chimici capabili să provoace o modificare tranzitorie propagabilă a stării receptorilor.

Din punct de vedere funcțional, receptorii se comportă ca *traductori*, adică sisteme capabile să transforme, pe baza anumitor legi de echivalență, o anumită formă de energie în alta. Receptorii biologici nu sînt însă simple dispozitive traductoare, deoarece energia impulsurilor nervoase nu pro-

vine de la stimul, acesta declanșînd eliberarea unei energii stocate prin metabolism în structurile receptoare care există sub formă potențială în starea de repaus a receptorului și care trece în formă manifestă sub acțiunea stimulului. Funcționarea receptorilor nu presupune deci numai un proces de traducere, ci și de *amplificare*, prin care energia uneori foarte mică a stimulului modulează o energie mult mai mare, de proveniență metabolică (§ VI.3.1.).

La metazoare, toți receptorii biologici determină apariția de impulsuri nervoase (adică semnale electrice) pe fibrele nervoase aferente, indiferent de natura stimulului ce a acționat asupra respectivului receptor. Subliniem din nou faptul că impulsul nervos este echivalentul universal în care este convertită toată informația senzorială, astfel că în etapele de prelucrare, sistemul nervos lucrează numai cu semnale electrice asemenea între ele, indiferent de natura cauzei primare ce le-a produs. Problemele prelucrării informației în rețelele neuronale formează obiectul neurociberneticii și de ele nu ne vom ocupa, în această prezentare referindu-ne numai la aspectele legate de funcționarea celulelor receptoare, nu a analizatorilor în ansamblu.

VI.1. EVOLUȚIA FORMAȚIUNILOR RECEPTOARE

Prin apariția celulelor receptoare specializate, *iritabilitatea difuză*, caracteristică întregii materii vii, a fost ridicată pe o treaptă superioară, aceea a excitabilității, existentă numai peste un anumit nivel de dezvoltare a organismelor. Surse bibliografice generale pentru această problemă sînt: Autrum (1959) și Duncan (1967).

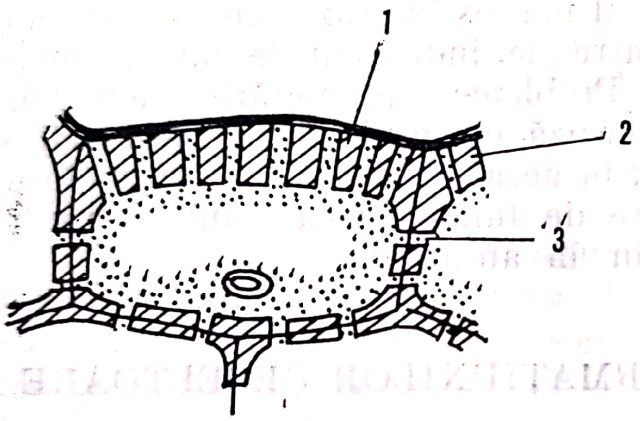
Chiar în cadrul regnului vegetal se poate vorbi despre sensibilitate, uneori diferențiată, față de agenți din mediu, această sensibilitate stînd la baza taxiilor, tropismelor, nastiilor*. Această sensibilitate este însă proprie tuturor celulelor epidermice ale plantei sau, cel puțin, unui organ al

* Taxiile reprezintă reacțiile față de stimuli ale organismelor vegetale care se deplasează liber (unicelulare), iar tropismele și nastiile sînt mișcările efectuate de către vegetalele fixate. În cazul tropismelor direcția depinde de aceea din care acționează stimulul, iar în cazul nastiilor este independentă de aceasta, stimulul putînd fi difuz. Nastiile se produc mai ales prin variații reversibile de turgescență și prin fenomene de creștere. Pentru o prezentare mai detaliată în limba română a excitabilității plantelor poate fi consultat, de exemplu, tratatul de fiziologie vegetală de Peterfi și Sălăgeanu (1972).

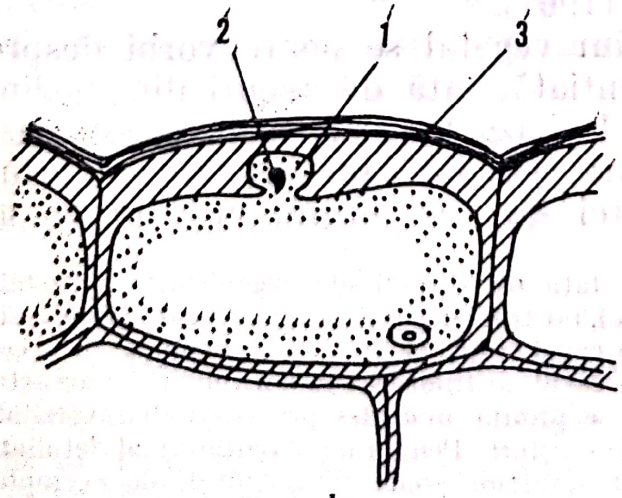
Scanned with OKEN Scanner

plantei (de exemplu, coleoptilului), nefiind vorba de celule receptoare specializate. Suportul anatomic al sensibilității de contact a celulelor epidermice ale plantelor îl constituie fie unele canale în peretele celulozic celular, numite *ectodesme* (fig. VI.1.a.), fie *punctele tactile*, constînd dintr-o evaginare a peretelui celular, în care se găsește un cristal de oxalat de calciu (fig. VI.1.b.). Datorită unor astfel de formațiuni, în citoplasmă se pot manifesta diferențe de presiune sau de tracțiune, ca urmare a excitării diferențiate a suprafeței celulare.

La unele plante (de exemplu, *Mimosa pudica*) are loc și un proces de conducere a excitației pînă la o distanță de 50 cm, cu viteze ce pot ajunge la 10 cm/s. Această viteză, relativ ridicată, indică participarea în procesul de con-



a



b

Fig. VI.1.: Formațiuni care asigură sensibilitatea de contact a celulelor epidermice ale plantelor. a) Ectodesmele (1); 2 — cuticula; 3 — plasmodesme; b) Punctele tactile: 1 — evaginare a peretelui celular extern; 2 — cristal; 3 — cuticula.

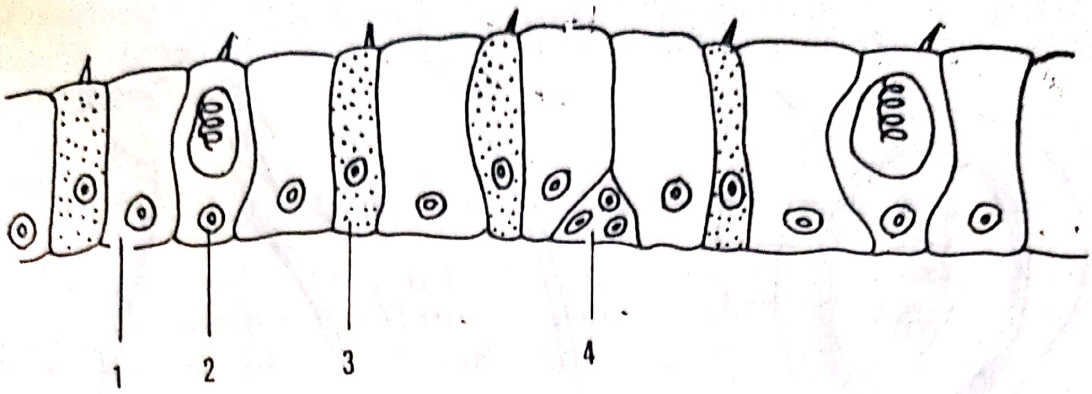


Fig. VI.2. : Secţiune prin partea externă a peretelui hidrei (ectoderm); 1 — celulă mioepitelială ; 2 — cnidoblast ; 3 — celulă senzorială ; 4 — celulă interstiţială.

ducere a excitaţiei a curenţilor electrici apăruţi ca urmare a leziunii produse într-un anumit loc de pe plantă. De asemenea, ar putea fi implicată o substanţă cu rol de mediator chimic, de exemplu acidul oxalic, substanţă care să fie condusă prin vase odată cu fluxul de transpiraţie.

Protozoarele, ca şi protistele vegetale, reacţionează comportamental la excitanţi (temperatură, gravitaţie, lumină, curenţi electrici, stimuli chimici, mecanici), însă chiar porţiuni separate din aceste organisme monocelulare, de exemplu la *Paramecium*, răspund la fel ca organismul întreg, astfel încît nu se poate vorbi despre existenţa unor receptori. Structuri cvasireceptoare localizate au fost descoperite numai la foarte puţine fitoflagelate (de exemplu, la *Euglena*), pe a căror membrană este o zonă sensibilă la lumină, zonă ce conţine pigmentul astaxantină.

Celenteratele posedă în cadrul ectodermului, în afara unor celule senzitive specializate, şi unele celule caracteristice, cnidoblastele, care acţionează atît ca receptori, cît şi ca efectori (fig. VI.2). Structura intracelulară specifică a cnidoblastelor este nematocistul, constînd dintr-o capsulă cu un pol liber care se continuă cu un flagel tras înăuntru şi răsucit. Ca răspuns la stimuli chimici sau mecanici, flagelul este propulsat în afară în cîteva milisecunde şi, prin el, capsula îşi deversează conţinutul de venin (fig. VI.3. a ; b.).

La toate nevertebratele superioare apar celule senzitive care în cazul cel mai simplu sînt separate, neunite în organe, localizate în epiteliu şi avînd forma celulelor epiteliale. La moluşte şi artropode apar organe senzitive prin gruparea şi specializarea receptorilor. Performanţele receptorilor ne-

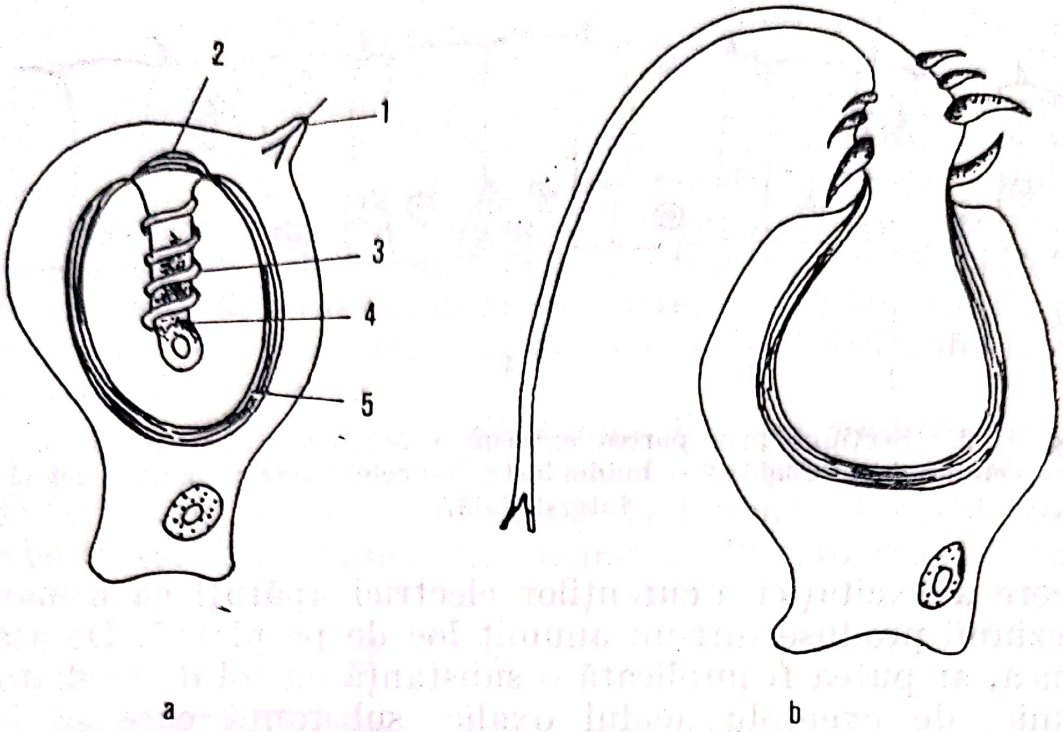


Fig. VI.3. : Cnidoblast în repaus (*a*) și cu flagelul evaginat (*b*). 1 — cnidocil ; 2 — opercul ; 3 — filament ; 4 — stilet ; 5 — capsulă.

vertebratelor sînt comparabile, iar uneori depășesc pe cele ale vertebratelor, inferioritatea analizatorilor nevertebratelor datorîndu-se posibilităților mai reduse de prelucrare a informației senzoriale primare.

VI.2. CARACTERISTICILE STIMULILOR ȘI CODIFICAREA LOR

După cum s-a menționat anterior, prin stimul sau excitant se înțelege variația unui parametru caracteristic al mediului cu care vin în contact detectorii sistemului excitabil respectiv, adică celulele receptoare. Astfel, excitația reprezintă un proces de interacțiune între două sisteme aflate în contact (receptorul și mediul ambiant), proces prin care variația unuia sau mai multor parametri ai mediului* determină o modificare tranzitorie a stării receptorului.

Indiferent de natura sa, orice stimul are o anumită intensitate, o anumită variație în timp, precum și o anumită

* În această definiție se încadrează atît exteroceptorii, cît și interoceptorii (proprioceptorii), căci prin mediu se înțelege în acest caz ambianța în care se găsește direct respectiva celulă receptoare, nu organismul în ansamblu.

distribuţie spaţială. Toate aceste caracteristici sînt purtătoare de informaţie, astfel încît analizatorii trebuie să le poată înregistra.

VI.2.1. Tipurile de stimuli şi de celule receptoare

Orice mediu ambiant al unui receptor este caracterizat prin compoziţia sa chimică, temperatură, presiune şi prin intensitatea diferitelor radiaţii existente. Variaţia fiecăruia dintre aceşti parametri poate reprezenta un stimul pentru anumiţi receptori biologici. O primă caracteristică a oricărui stimul este deci natura sau *calitatea* sa. Există astfel stimuli mecanici, chimici, termici (radiaţii infraroşii) şi luminoşi (radiaţii electromagnetice din domeniul vizibil). Codificarea calităţii stimulilor se realizează prin existenţa unor receptori specifici pentru fiecare tip de stimul ce poate fi detectat. Astfel, la organismele superioare, de exemplu la om, se întîlnesc o serie de tipuri de receptori, în funcţie de natura stimulului (tabelul VI.1).

TABELUL VI.1

Tipurile de receptori prezenţi la mamifere

Stimulul	Tipul de receptor şi funcţia sa
Forţă mecanică	Mecanoreceptorii: a) tango- şi baroreceptorii din piele şi ţesutul subcutanat cu rol în sesizarea atingerii şi a presiunii; b) mecanoreceptorii (celulele ciliate) din cohlee, cu rol în sesizarea undelor sonore; c) mecanoreceptorii vestibulari cu rol în sesizarea poziţiei şi a mişcării; d) receptorii de tensiune din muşchi şi tendoane; e) receptorii viscerali de presiune, de exemplu din sinusul carotidian
Radiaţii electromagnetice din domeniul infraroşu	Termoreceptorii cutanaţi, sensibili la cald (corpusculi Ruffini) şi la rece (corpusculi Krause)
Radiaţii electromagnetice din domeniul vizibil	Fotoreceptorii din celulele cu conuri şi cu bastonaşe ale retinei
Substanţe în soluţie	Chemoreceptori separaţi pentru gust şi miros; Chemoreceptori, în particular osmoreceptori, carotidieni şi hipotalamici

În clasificarea receptorilor după natura stimulilor se are în vedere acel tip de stimul pentru care o anumită celulă receptoare prezintă sensibilitate selectivă, avînd pragul minim de excitare. Există însă și o grupă de receptori care au sensibilitate redusă pentru toate tipurile de stimuli, dar răspund atunci cînd aceștia ating valori periculoase. De aceea C. Sherrington i-a denumit *nociceptori* și, fiindcă acești receptori mediază senzațiile de durere, se mai numesc și *algoceptori*.

Date fiind semnificația umană cu totul particulară a durerii, cît și importanța ei deosebită în semiologia medicală, în subcapitolul VI.6 sînt prezentate mecanismele fundamentale ale recepției durerii.

Tipurile de receptori pe care îi posedă un anumit organism, ca și gradul lor de dezvoltare, reflectă fidel necesitățile adaptative corespunzătoare mediului în care trăiește acel organism. Astfel, la animalele marine, receptorii olfactivi sînt fie inexistenți, fie puțin dezvoltați, în schimb o mare parte din pești posedă electroreceptori foarte dezvoltați cu ajutorul cărora detectează corpurile din jur pe baza perturbației produse de către acestea asupra cîmpurilor electrice.

Se cunoaște de mult timp faptul că există unii pești (de exemplu, *Electrophorus electricus*) care posedă un așa-numit organ electric ce generează pulsuri suficient de puternice (în jur de 200 V) pentru a paraliza animalele marine care le servesc drept pradă. Relativ recent, s-a descoperit că numeroase alte specii de pești, din cel puțin trei familii diferite (*Gymnotidae*, *Gymnarchidae* și *Mormiridae*) posedă și ele organe electrice, capabile să emită însă numai pulsuri slabe (aproximativ de 1 V), fie sub formă de salve scurte, fie în mod continuu. Peștii respectivi posedă în cadrul liniei laterale (fig. VI.4.) elemente receptoare capabile să detecteze eventualele distorsiuni produse de către obiectele din jur, fie conductori, fie izolatori, asupra cîmpului electric produs de către ei înșiși sau să sesizeze prezența unor cîmpuri electrice care se compun cu acestea.

Sensibilitatea acestor electrodetectori este foarte ridicată, de exemplu la *Gymnarchus niloticus*, fiind detectabile și evidențiate prin modificări comportamentale ale peștelui variații de cîmp electric de $3 \cdot 10^{-6}$ V/m.

Alți pești, ca de exemplu somnul și rechinul, nu generează un cîmp electric propriu, dar pot detecta semnale elec-

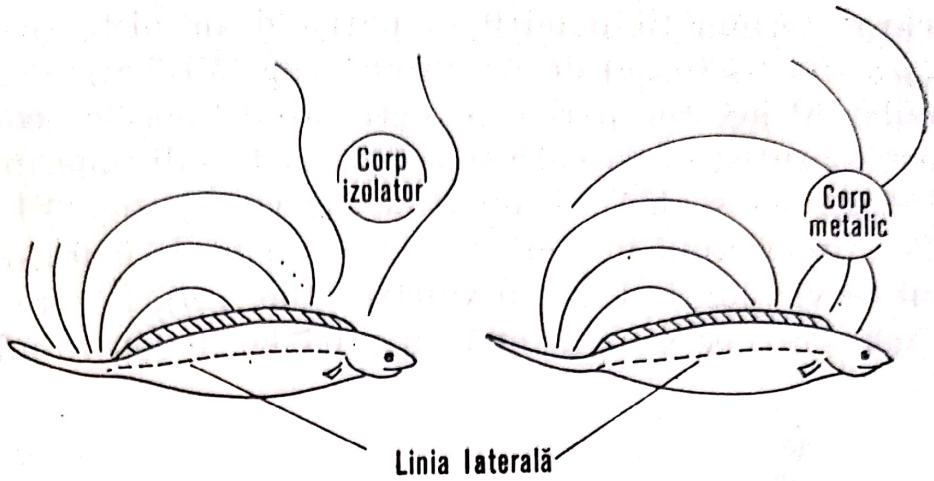


Fig. VI.4. : Distorsiunea produsă de obiecte izolatoare şi bune conducătoare asupra liniilor cîmpului generat de organul electric al peştelui *Gymnarchus niloticus*.

trice de genul biopotenţialelor tisulare emise de către organismele din vecinătatea lor.

Acestor două tipuri de detecţie electrică le corespund două tipuri diferite de receptori. Sistemul de detecţie activă (a perturbaţiilor produse asupra cîmpului electric emis de animalul respectiv) are ca receptori organele tuberoase, sensibile la stimuli electrici de înaltă frecvenţă şi insensibile la curenţi continui. Impulsurile transmise de aceşti receptori pe fibrele nervoase respective sînt corelate cu descărcările organului electric. Sistemul de detecţie pasivă (sensibil la energia provenită din surse externe) are ca receptori organele ampulare Lorenzini, ale căror celule receptoare transmit impulsuri pe fibrele nervoase aferente, în mod continuu şi ritmic, frecvenţa acestor impulsuri modificîndu-se în funcţie de potenţialul extern detectat.

La insectele care trăiesc în „oceanul aerian", receptorii olfactivi au în mod evident o importanţă primordială, fiind foarte perfecţionaţi nu numai în vederea detectării hranei, ci şi pentru orientarea activităţii sexuale, datorită unor substanţe specifice (feromoni), emanate de către insectele de un sex şi detectate, cu o sensibilitate extraordinară, de către partenerii de sex opus. De exemplu, femela fluturelui de mătase (*Bombyx mori*) prezintă nişte glande epidermice abdominale care emană o substanţă alcoolică numită bombicol; aceasta nu este detectată de către antenele femelelor, ci numai de celulele receptoare din antenele masculilor (Schneider, 1970). Aceste celule receptoare sînt neuroni ale

căror terminații dendritice pătrund în niște peri olfactivi (*sensilla trichodea*) de pe antenă (fig. VI.5.a.). Peretele cuticular al acestor peri este perforat de pori ce comunică cu exteriorul și de la care se continuă tubuli pînă în substanța lichidă ce scaldă terminațiile nervoase (fig. VI.5.b și c.). Pe antena unui mascul de *B. mori* sînt 16 000 astfel de peri olfactivi (lungi de aproximativ 100 μm), fiecare avînd cîte 2000 pori ce se continuă cu pînă la 20 000 tubuli. Rezultă

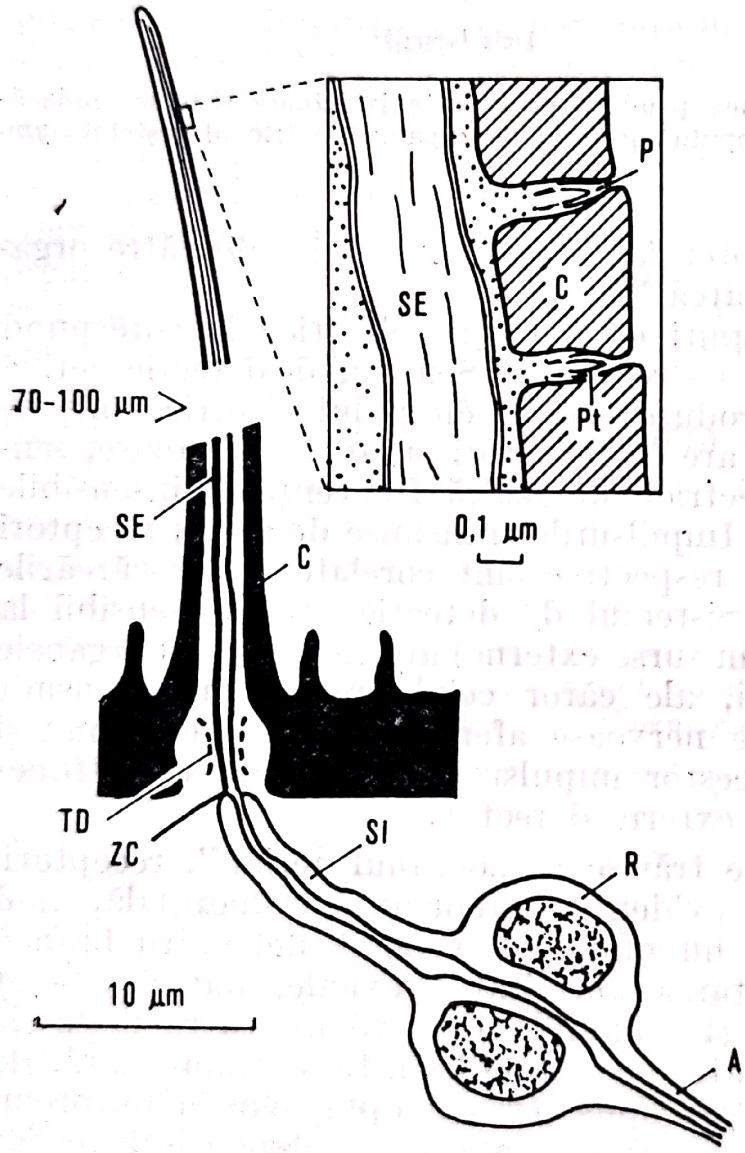


Fig. VI.5. (după Schneider, 1970): Schemă a secțiunii longitudinale printr-un păr olfactiv la *Bombyx mori*. *A* — axonul și *R* — soma celulelor receptoare; *C* — cuticula, *SI* și *SE* segmentele interne și externe ale dendritelor; *P* — por; *Pt* — tubulii porului; *TD* — teaca extracelulară a dendritelor; *ZC* — zona ciliară a dendritelor.

clar extraordinara specializare a acestui sistem de captare a moleculelor de bombicol, ceea ce permite ca o singură moleculă din această substanţă să declanşeze un răspuns electric într-o celulă receptoare, iar răspunsul comportamental al animalului să se producă chiar şi numai la 200 de molecule detectate de către fiecare antenă.

O serie de animale, ca de exemplu unii şerpi, posedă un aşa-numit organ termic, în care sînt grupaţi un mare număr de receptori de radiaţii infraroşii, cu ajutorul cărora pot fi detectate şi localizate animalele ce le pot servi drept pradă, pe baza radiaţiei lor termice. Astfel, şarpele-cu-clopoţei (*Crothalus*) are, într-un infundibul de pe partea frontală a capului, o membrană groasă de 10—15 μm, bogat vascularizată şi în care sînt numeroase terminaţii dendritice ramificate. Acestea pot detecta variaţii de temperatură de 0,001°C, corespunzînd unei cantităţi de căldură de 10^{-11} cal, primită în 0,1 s de către suprafaţa membranară inervată de o singură fibră.

Trebuie subliniat că, deşi se cunosc un mare număr de receptori pentru diferitele tipuri de stimuli, este foarte probabil să existe încă receptori necunoscuţi, atît la organismele mai puţin studiate, de exemplu la peştii de mare adîncime, cît şi chiar la organismele intens studiate, la acestea în special interoceptori.

În această enumerare, ilustrativă şi nu exhaustivă, a tipurilor de celule receptoare, ne-am oprit asupra unor receptori mai puţin comuni. Un exemplu extrem de pregnant de înaltă specializare îl oferă şi fotoreceptorii, celulele cu conuri şi cu bastonaşe. Funcţionarea acestor receptori va fi prezentată aparte, atît pentru a exemplifica într-un caz concret principiile structurale şi funcţionale comune tuturor receptorilor, cît şi fiindcă mecanismul biofizic al fotoreceptiei este cel mai bine cunoscut pînă în prezent.

Încheiem consideraţiile referitoare la tipurile de receptori specializaţi pentru a înregistra variaţiile diferiţilor parametri ai mediului ambiant, observînd că absenţa unor receptori care să detecteze radiaţiile ionizante (razele X şi radiaţiile nucleare) face ca această noxă, relativ recent introdusă de către om în cadrul biosferei, să aibă un caracter deosebit de insidios.

Scanned with OKEN Scanner

VI.2.2. Codificarea intensității și a distribuției în spațiu și timp a stimulilor

Intensitatea stimulilor este codificată prin amplitudinea răspunsului receptorilor. Relațiile între stimul și răspuns sînt prezentate în paragraful următor, în care este descrisă secvența etapelor ce duc la producerea de impulsuri nervoase în fibrele nervoase senzitive. Referitor la intensitatea stimulilor ce pot fi detectați de către receptorii biologici, trebuie relevată sensibilitatea înaltă a acestora, sensibilitate care, în majoritatea cazurilor, depășește cu mult pe aceea a dispozitivelor construite de către om. Pe de altă parte însă, faptul că atît celulele receptoare, cît mai ales structurile neurale cu care sînt asociate prezintă *praguri* de funcționare caracteristice (adică valori critice care trebuie atinse de către stimuli pentru a produce un răspuns în analizator) este important prin aceea că permite protecția sistemului nervos de o avalanșă de informație senzorială care l-ar solicita în mod inutil pentru viața organismului respectiv.

Se constată că răspunsul unui receptor la un stimul de intensitate constantă nu rămîne invariabil, ci scade în timp, acesta fiind fenomenul de *adaptare*. După rapiditatea cu care se produce adaptarea, receptorii sînt de două tipuri: cu adaptare lentă sau tonici și cu adaptare rapidă sau fazici.

Exemple caracteristice de receptori tonici sînt fusurile neuromusculare și, în general, baroceptorii, iar ca receptori fazici putem cita tangoceptorii și, în particular, corpusculii

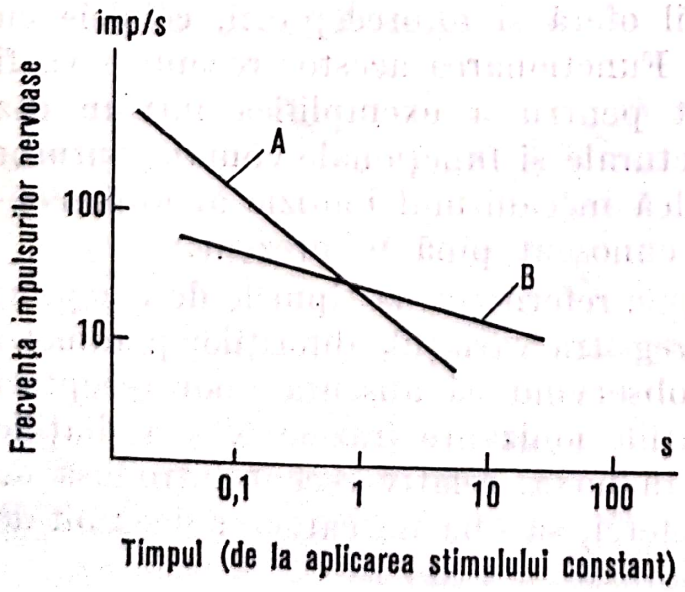


Fig. VI.6. (modificată după Thorson și Biederman-Thorson, 1974): Scăderea frecvenței impulsurilor nervoase pe fibrele aferente unui receptor cu adaptare rapidă (*A*) și lentă (*B*).

Pacini. Pentru a studia şi descrie matematic fenomenul de adaptare se izolează receptorul împreună cu fibra senzitivă aferentă, se aplică un stimul tip treaptă (de intensitate constantă) asupra receptorului şi se înregistrează frecvenţa potenţialelor de acţiune care se propagă pe fibra nervoasă. Considerînd această frecvenţă drept răspunsul receptorului, R, scăderea sa în timp, t, exprimă fenomenul de adaptare. Thorson şi Biederman — Thorson (1974) au reprezentat grafic dependenţa dintre R şi t pentru diferite tipuri de receptori, constatînd că în toate cazurile aceasta este de forma (fig. VI.6):

$$\log R = \log C - k \log t$$

în care C este o constantă. Această relaţie poate fi scrisă şi în forma:

$$R = C \cdot t^{-k},$$

arătînd că răspunsul receptorilor scade invers proporţional cu o putere k a timpului scurs de la aplicarea stimulului constant. Receptorilor tonici le corespund valori mici ale k, iar receptorilor fazici, valori mai mari.

Aclimatizarea este un fenomen diferit de adaptare, constînd în modificarea pragului receptorului faţă de stimuli care se repetă, adică în scăderea (sau uneori creşterea) sensibilităţii faţă de acei stimuli. Atunci cînd un receptor este menţinut în contact îndelungat cu un anumit tip de stimuli, se produce fenomenul de *oboseală*, adică scăderea amplitudinii răspunsului, posibil ca urmare a epuizării rezervelor energetice metabolice care asigură funcţionarea respectivei structuri receptoare.

Prin intermediul diferitelor tipuri de răspuns ale receptorilor este codificată şi distribuţia în timp a stimulilor, adică *protensitatea* acestora. Astfel, receptorii tonici generează impulsuri pe fibrele nervoase senzitive tot timpul cît sînt în contact cu stimulul; alţi receptori generează unul sau mai multe impulsuri numai la începutul stimulării (receptorii de tip ON), alţii la încetarea acesteia (receptorii de tip OFF), iar alţii şi la început şi la sfîrşit (receptorii de tip ON—OFF) (fig. VI.7.). Toate aceste trei tipuri de receptori au fost identificate, de exemplu, în ochiul compus al crabului *Limulus*, iar răspunsuri ON, OFF şi ON—OFF sînt întîlnite şi la celulele ganglionare din retină.

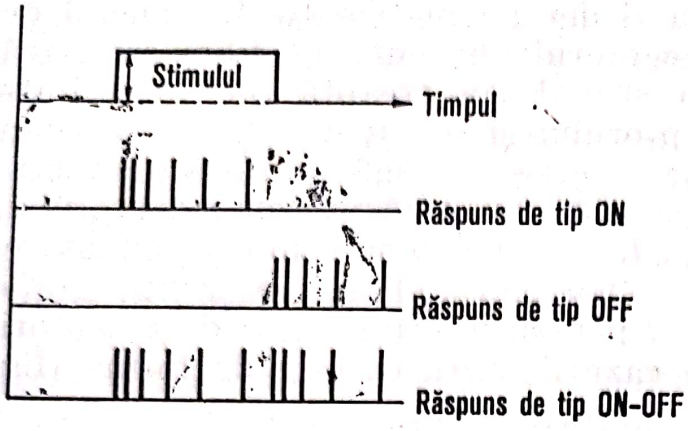


Fig. VI.7.: Tipurile de răspuns ale receptorilor. Fiecare linie verticală reprezintă un impuls nervos generat pe fibra senzitivă aferentă receptorului.

Deoarece răspunsul receptorilor la stimuli se face cu o anumită latență și toate etajele analizatorilor se caracterizează prin latențe și perioade refractare specifice (de ordinul a 1 ms), se poate vorbi de o cuantificare biologică a timpului, în sensul că stimulii care se succed la intervale de timp mai mici decît aceste perioade fie că nu sînt percepuți deloc, fie că nu sînt percepuți distinct, ci fuzionat.

Distribuția spațială a stimulilor — *extensitatea* — este codificată în primă instanță datorită existenței *cîmpurilor receptive*. Această noțiune desemnează zona periferică în care toți receptorii de un anumit tip sînt conectați la aceeași fibră nervoasă, constituind deci o *unitate senzitivă*. Dimensiunile cîmpurilor receptive sînt foarte diferite, variind de la aria de ordinul 1 μm^2 a unui singur receptor terminal, pînă la cîteva zeci de cm^2. Discriminarea spațială, determinată de corelarea la niveluri superioare a informațiilor despre același stimul, provenite prin diferite canale primare, se realizează prin suprapunerea parțială a mai multor cîmpuri receptive. Pentru codificarea distribuției spațiale a stimulilor servește și intensitatea acestora, în cazul tuturor telereceptorilor, ca și intervalul de timp între momentele în care respectivul stimul excită diferitele cîmpuri receptive (de exemplu, întîrzierea cu care unda sonoră ajunge la cele două urechi).

Referitor la diferitele caracteristici ale stimulilor, trebuie subliniat că în ceea ce privește codificarea calității și intensității, rolul major revine proceselor de la nivelul receptorilor înșiși, în timp ce pentru codificarea distribuției temporale și spațiale intervin etapele ulterioare de prelucrare a informației, în etajele superioare ale analizatorilor.

VI.3. PRINCIPIILE GENERALE ALE STRUCTURII ŞI FUNCŢIONĂRII CELULELOR RECEPTOARE

Cu toate că receptorii organismelor de pe diferite trepte de evoluţie, specializaţi pentru detectarea diferitor tipuri de stimuli, sînt de o extremă diversitate, se poate distinge o schemă generală a structurii şi funcţionării lor.

Cu puţine excepţii, celulele receptoare (senzitive) sînt incluse într-un strat de celule epiteliale. Indiferent de treapta evolutivă a organismului (de la meduze pînă la om) şi de natura stimulului pentru care sînt specializate celulele senzitive, acestea prezintă o schemă de alcătuire similară. Astfel, se poate distinge o regiune specializată în funcţie de stimul, numită adesea segment extern, conectată prin structuri ciliare bazale de o regiune bazală bogată în mitocondrii şi în vezicule (fig. VI.8).

De regulă (cu excepţia fotoreceptorilor), segmentul extern este îndreptat în afară, ieşind în mediul exterior epiteliului, iar mitocondriile sînt în vecinătatea membranei bazale, în-

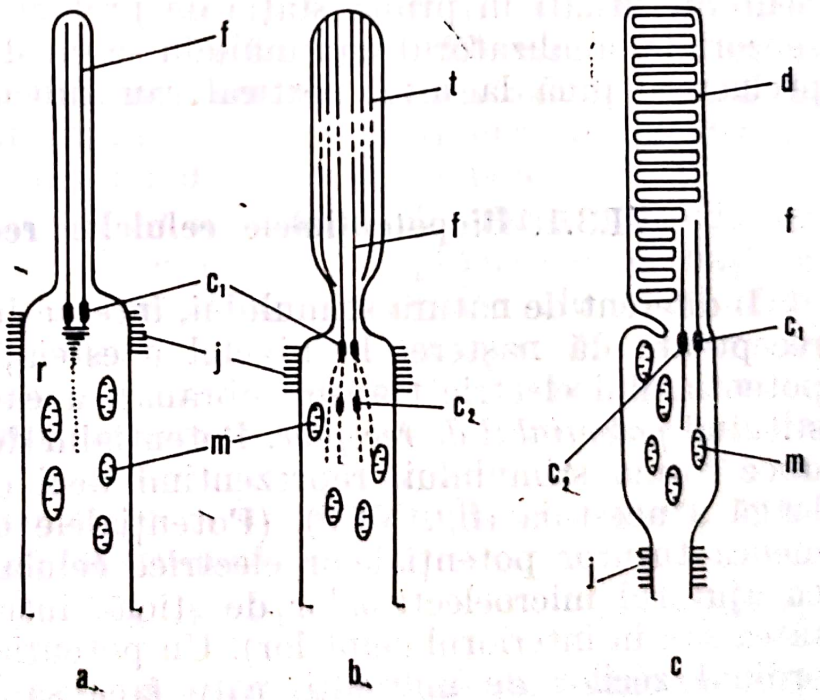


Fig. VI.8. (după Thurm, 1974): Reprezentare schematică a porţiunilor terminale ale diferitelor celule senzitive de origine epitelială. *A* — chemo- şi mecanoreceptor din auriculul planariilor; *B* — mecanoreceptor din perii senzitivi ai insectelor; *C* — bastonaş (fotoreceptor) de la vertebrate; C_1, C_2 — centrioli; *d* — discuri membranare; *f* — filamente ciliare; *j* — complexe joncţionale cu celulele învecinate; *m* — mitocondrii; *r* — rădăcinile filamentelor; *t* — microtubuli.

conjurată de mediul intercelular. Rolul mitocondriilor este, în mod evident, de a furniza pompelor ionice membranare necesarul de ATP pentru menținerea gradienților ionici, dar rolul veziculelor din regiunea bazală nu este încă cunoscut.

Cel mai frecvent, în special la metazoarele evoluate, celulele receptoare sînt plasate în cadrul unor structuri accesorii aneurale ale respectivului organ de simț, structuri al căror rol este de a proteja elementele receptoare și de a concentra și canaliza energia stimulului, astfel încît interacțiunea acestuia cu celulele receptoare să decurgă cu eficiență maximă.

Ca exemple tipice de structuri accesorii putem cita componentele globului ocular pînă la retină, sau componentele urechii pînă la organul lui Corti. Celulele receptoare sînt conectate printr-o sinapsă cu terminațiile dendritice, amielinizate, ale unui neuron senzitiv, ce poate fi plasat atît în afara organului de simț (de exemplu, neuronii senzitivi din ganglionii laterovertebrali), cît și la nivelul respectivului organ de simț (de exemplu, celulele ganglionare din retină). Axonii neuronilor senzitivi sînt conectați sinaptic cu alți neuroni, situați în prima stație de prelucrare a informației senzoriale, analizatorul continuîndu-se cu diferitele etaje de prelucrare pînă la nivel cortical sau subcortical.

VI.3.1. Biopotențialele celulelor receptoare

Indiferent de natura stimulului, interacțiunea sa cu celula receptoare dă naștere, la nivelul acesteia, unei variații a potențialului electric transmembranar, această variație constituind *potențialul de receptor*. Potențialul de receptor reproduce forma stimulului, reprezentînd deci o traducere analoagă a acestuia (fig. VI.9). (Potențialele de receptor, asemenea tuturor potențialelor electrice celulare, pot fi culese cu ajutorul microelectrozilor de sticlă, introduși în vecinătatea sau în interiorul celulelor). Un potențial de receptor de ordinul zecilor de milivolți, care face să circule timp de cîteva milisecunde un curent de ordinul a 10^{-9}A, implică debitarea de către celula receptoare a unei energii de ordinul a 10^{-13} J. Dacă stimulul care a declanșat acest răspuns este o cuantă de lumină cu lungimea de undă 500 nm, energia sa este 4×10^{-19} J, fiind deci cu multe ordine de mărime inferioară energiei răspunsului celulei receptoare. Acest exemplu

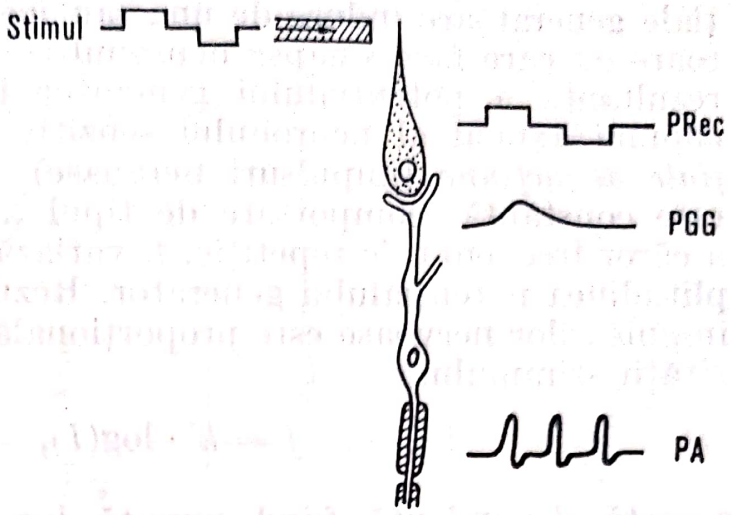


Fig.VI.9. (după Flock, 1971): Schemă a biopotenţialelor implicate în funcţionarea receptorilor, ilustrate pentru cazul unui mecanoreceptor. *PRec* — potenţial de receptor la nivelul celulei receptoare; *PGG* — potenţial generator gradat la nivelul dendritelor neuronului senzitiv, *PA* — potenţiale de acţiune pe axonul neuronului senzitiv.

ilustrează faptul că, încă de la nivelul celulelor receptoare, procesul de traducere a unui stimul de o natură oarecare într-un fenomen bioelectric se face prin eliberarea de energie furnizată de metabolismul celular. Unica sursă directă a acestei energii sînt gradienţii ionici electrochimici, menţinuţi prin activitatea pompelor de sodiu şi potasiu.

Potenţialul de receptor determină eliberarea de mediator chimic sinaptic de către celula receptoare, dînd naştere astfel — la nivelul terminaţiilor dendritice ale neuronului senzitiv — unei variaţii de potenţial numită *potenţial generator*. Forma potenţialului generator nu mai reproduce forma stimulului, dar amplitudinea sa, A, variază gradat în funcţie de aceea a potenţialului de receptor, deci de intensitatea stimulului, I. Se constată că în cazul multor receptori, între A şi I este o relaţie logaritmică:

$$A = k \cdot \ln(I), \qquad \text{(VI.1)}$$

dar uneori datele experimentale concordă mai bine cu alte tipuri de relaţii, de exemplu:

$$A = k \cdot I^n. \qquad \text{(VI.2.)}$$

La nivelul membranei somatodendritice a neuronului senzitiv, potenţialul generator se propagă cu decrement şi are loc o însumare spaţială şi temporală a diferitelor poten-

ţiale generatoare induse de una sau mai multe celule receptoare cu care face sinapse neuronul respectiv. Amplitudinea rezultantă a potenţialului generator determină la nivelul conului axonal al neuronului senzitiv apariţia unor *potenţiale de acţiune* (impulsuri nervoase), a căror amplitudine este constantă (comportare de tipul „tot sau nimic"), dar a căror frecvenţă de repetiţie, f, variază proporţional cu amplitudinea potenţialului generator. Rezultă deci că frecvenţa impulsurilor nervoase este proporţională cu logaritmul intensităţii stimulului:

$$f = k' \cdot \log(I), \qquad \text{(VI.1'.)}$$

această dependenţă fiind numită legea lui Adrian, după numele fiziologului englez care a constatat-o experimental (§ III. 1.2.). Uneori frecvenţa impulsurilor nervoase poate să fie reprezentată ca o putere a intensităţii stimulului:

$$f = k' \cdot I^n. \qquad \text{(VI.2'.)}$$

Relaţiile (VI.1'.) şi (VI.2'.) exprimă baza fiziologică a legilor psihofizice care leagă intensitatea senzaţiei subiective de intensitatea excitaţiei, adică a binecunoscutei legi Weber-Fechner şi, respectiv, a legii propuse de Stevens (1961).

După integrarea produsă la nivelul dendritelor, la nivelul segmentului iniţial al axonului neuronului senzitiv are loc o traducere analogo-digitală, căci pe fibrele senzitive se propagă impulsuri nervoase identice ca formă, dar cu frecvenţă variabilă de repetiţie (modulate în frecvenţă). (Termenul „digital" = cifric exprimă în acest context doar faptul că, într-un interval oarecare de timp, pe fibra senzitivă trec un număr întreg de impulsuri nervoase asemenea între ele). Pe fibrele nervoase, impulsurile se propagă fără decrement şi determină la nivelul terminaţiilor axonale eliberarea de mediator chimic sinaptic, în cantitate proporţională cu frecvenţa impulsurilor, deci are loc o traducere digitalo-analoagă.

Cele trei potenţiale electrice care intervin în funcţionarea receptorilor biologici sînt ilustrate în fig. VI.9., iar pe baza celor de mai sus, se poate alcătui o schemă sinoptică a structurii şi funcţionării receptorilor (tabel VI.2.). Această schemă descrie cazul cel mai general, dar, în diferite situaţii particulare, unele etape pot fi fuzionate. Astfel, pentru mulţi mecanoreceptori (corpusculi Pacini etc.) potenţialul de receptor

TABELUL VI. 2

Schemă sinoptică a structurii și funcției receptorilor

STRUCTURA MACROSCOPICĂ:	Organ de simț						Nerv senzitiv	Centru	
STRUCTURA MICROSCOPICĂ:	Structuri accesorii (aneurale)	Celulă receptoare (aneurală sau specializări neuronale)	Sinapsă	Neuron senzitiv				Terminații axonale	Sinapsă
				Dendrită	Soma	Segment inițial	Axon		
FUNCȚIA RESPECTIVEI STRUCTURI:	Protejare, sensibilizare, concentrare	Traducere, amplificare	Transmitere	Integrare și generare de impulsuri			Propagare	Transmitere	
FENOMENUL ȘI SUPORTUL SĂU:	Stimul (energie externă) →	Potențial de receptor →	Mediere chimică →	Potențial generator →			Impulsuri nervoase →	Mediere chimică	

Scanned with OKEN Scanner

și generarea impulsurilor nervoase au loc în aceeași celulă, așa încît în aceste cazuri este greu de distins între potențialul de receptor și potențialul generator.

Pe baza descifrării fenomenologiei funcționării receptorilor, au fost realizate numeroase modele capabile să simuleze răspunsul acestora la stimuli (Deutsch, 1967; Harmon și Lewis, 1966). Un astfel de model electronic constă dintr-un traductor de tip exponențial (de exemplu, o celulă fotoelectrică), ce transformă un stimul de o natură oarecare într-un potențial electric, o rețea rezistor-inductor-capacitor, un amplificator, un oscilator de relaxare și un generator de pulsuri (Deutsch, 1971). Un astfel de montaj generează impulsuri electrice asemenea potențialelor de acțiune axonale, cu o frecvență proporțională cu amplitudinea potențialului dat de traductor, acest potențial depinzînd la rîndul său de stimulul aplicat, conform cu legea de funcționare a traductorului (care în acest caz este de tip exponențial).

În toată prezentarea anterioară a funcționării celulelor receptoare a fost discutat numai aspectul fenomenologic, fără nici o referire la procesele care se petrec la nivel molecular. Înainte însă de a aborda mecanismele diferitelor tipuri de receptori, în legătură cu schema generală de funcționare schițată mai sus, este locul să conturăm într-un mod mai precis problema generării și transmiterii informației senzoriale.

VI.4. INFORMAȚIA SENZORIALĂ *

În studiul analizatorilor în general și, în particular, referitor la funcționarea celulelor receptoare și a neuronilor senzitivi se utilizează în mod frecvent termenii: *semnal*, *mesaj*, *informație*, care în epoca noastră au căpătat o întrebuințare cotidiană tot mai frecventă. Dată fiind însă tocmai varietatea de nuanțe și caracterul antropocentric ce li se atribuie acestor termeni în utilizările curente, se impune precizarea conținutului lor și a accepției în care îi folosim în contextul neurobiofizicii.

* O prezentare introductivă a mecanismelor cibernetice de funcționare ale sistemului nervos a fost făcută de Nicolau și Bălăceanu (1967). Teoria informației este prezentată pe larg din punct de vedere fizic de Brillouin (1959) și tehnic de Spătaru (1965).

Semnalul este orice manifestare fizică ce exprimă starea unui sistem şi care se poate propaga printr-un mediu oarecare. Variaţiile parametrilor fizico-chimici ai mediului ambiant al unei celule receptoare, variaţii pe care le-am numit stimuli, constituie, atunci cînd se pot propaga, semnale despre starea respectivului mediu. La rîndul lor, potenţialele de acţiune ale diferitelor celule excitabile reprezintă semnale despre starea acestor celule. Sistemul a cărui stare se modifică constituie sursa care generează semnalele. În cazurile menţionate, sursa este fie mediul extern, fie o celulă receptoare, fie chiar neuronul senzitiv.

Semnalul, de exemplu un impuls nervos, este o entitate elementară, prin definiţie indivizibilă şi repetabilă. În mod obişnuit, nici o sursă nu generează semnale unice, ci ansambluri de semnale care constituie *mesaje* despre starea sursei. De pildă, o succesiune de impulsuri nervoase, apărute într-un interval de timp la conul axonal al unui neuron, reprezintă un mesaj despre starea membranei somatodendritice.

După modul de variaţie, semnalele pot fi *discrete* (sau discontinue), aşa cum sînt impulsurile nervoase, şi *continue*, aşa cum este variaţia de potenţial a celulelor receptoare (§ VI.3.1.).

Cel mai simplu sistem de comunicaţie constă numai dintr-o sursă de semnale, un canal de comunicaţie (mediu prin care se transmit semnalele) şi un destinatar al semnalelor. O schemă adecvată pentru circulaţia informaţiei senzoriale este reprezentată în fig. VI.10.

Mesajele, ca ansambluri de semnale, sînt purtătoare de informaţie, în sensul că în urma recepţionării lor de către destinatar se înlătură nedeterminarea existentă anterior în legătură cu starea sursei. Se poate deci vorbi despre transmiterea de informaţie prin semnale numai atunci cînd starea sursei nu este precizată înainte de primirea mesajului.

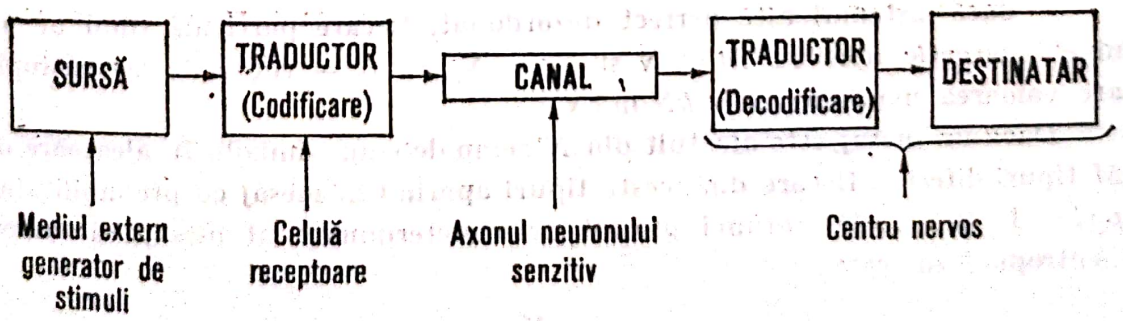


Fig. VI.10. : Principalele componente ale unui canal de transmitere a informaţiei senzoriale.

Altfel spus, dacă o sursă generează semnale a căror desfășurare în timp este perfect determinată dinainte de recepționarea lor, ea nu este sursă de informație. Numai semnalele aleatoare sînt purtătoare de informație.

VI.4.1. Măsura cantității de informație

În 1948 Ch. Shannon, studiind procesul de comunicație prin semnale de orice natură, a definit *informația* purtată de un semnal prin nedeterminarea pe care o înlătură recepționarea acelui semnal. Pentru a stabili o măsură cantitativă a gradului de nedeterminare al unui mesaj și, deci, a informației obținute prin recepționarea sa, Shannon a făcut analogia cu gradul de dezordine al unui ansamblu statistic de atomi sau molecule, exprimat de entropia sa.

L. Boltzmann a arătat că pentru N particule identice (atomi sau molecule) care se pot distribui pe M nivele energetice distincte, cîte N_i pe fiecare nivel ($i = 1, 2, \ldots, M$) gradul de nedeterminare a stării reale a ansamblului de particule, deci gradul de dezordine poate fi definit prin:

$$S = -k \cdot N \cdot \sum_{i=1}^{M} \frac{N_i}{N} \ln\left(\frac{N_i}{N}\right). \qquad \text{(VI.3.)}$$

Mărimea S definită astfel este entropia ansamblului de particule, k este o constantă fizică universală (constanta lui Boltzmann — $1{,}38 \cdot 10^{-23}$ J/K), iar rapoartele N_i/N reprezintă probabilitățile de ocupare a fiecărui nivel energetic: $p_i = N_i/N$. Deoarece $\sum_{i=1}^{M} N_i = N$, rezultă în mod evident că $\sum_{i=1}^{M} p_i = 1$. Se poate verifica ușor faptul că entropia exprimă gradul de dezordine al ansamblului, deoarece:

— dacă starea tuturor particulelor este aceeași, sistemul fiind perfect ordonat $S = 0$,

— dacă sistemul este perfect dezordonat, fiecare particulă fiind pe un nivel energetic aparte: $M = N$ și $N_1 = N_2 = \ldots = N_N = 1$, iar entropia are valoarea maximă: $S = kN \ln(N)$.

Dacă un mesaj este alcătuit din N semnale (sau simboluri) aleatoare de M tipuri diferite, fiecare din aceste tipuri apărînd în mesaj cu probabilitatea $p_i (i = 1, 2, \ldots, M)$, atunci gradul de nedeterminare al mesajului, adică „entropia" sa, este:

$$H' = -kN \sum_{i=1}^{M} p_i \ln(p_i). \qquad \text{(VI.4.)}$$

Formula (VI.4) este identică cu (VI.3.), acum k fiind o altă constantă care depinde de unitatea de măsură aleasă. Mărimea H' exprimă cantitatea de informație purtată de mesajul respectiv. Raportată la un singur semnal, cantitatea medie de informație este:

$$H = \frac{H'}{N} = -k \sum_{i=1}^{M} p_i \ln (p_i).$$

Unitatea de măsură cel mai larg utilizată pentru cantitatea de informație este *bit*-ul: informația obținută prin recepționarea unui semnal atunci cînd nu sînt posibile decît 2 semnale diferite egal probabile. În acest caz $k = \frac{1}{\ln 2}$, iar formula cantității de informație exprimată în bit este:

$$H = -\sum_{i=1}^{M} p_i \log_2 (p_i). \qquad \text{(VI.5.)}$$

Dacă semnalele nu sînt discrete, putînd fi grupate într-un număr M de tipuri, ci variază în mod continuu în funcție de un anumit parametru x, atunci în locul ansamblului de probabilități $p_1, p_2, \cdots, p_M$ cu care apare fiecare semnal discret există o repartiție continuă cu densitatea de probabilitate $p(x)$, astfel încît:

$$\int_x p(x)\, dx = 1.$$

În acest caz, cantitatea de informație este:

$$H = -\int_x p(x) \log_2 p(x)\, dx.$$

În mod practic însă, este întotdeauna necesar să se treacă de la o repartiție continuă la una discretă, împărțind domeniul de variație al parametrului x într-un număr cît mai mare de intervale și asociind fiecărui interval probabilitatea ca semnalul continuu să se găsească în acel domeniu.

VI.4.2. Cantitatea de informație transmisă prin ansambluri de impulsuri nervoase

Pe baza acestor noțiuni de teoria informației, schema generală de funcționare a receptorilor (§ VI.3.1.) poate fi interpretată în felul următor: stimulii din mediul extern constituie semnale pentru celulele receptoare care la rîndul lor

generează semnale cu spectru continuu (potențialul de receptor și / sau potențialul generator). În porțiunea inițială a axonului neuronului senzitiv se produce un proces de codificare sau modulație prin care o variație continuă de potențial este transformată într-un proces discontinuu—generarea de impulsuri nervoase. Ansamblul acestor impulsuri este purtătorul informației senzoriale către centrii nervoși unde au loc procese de decodificare și prelucrări multiple (în special, la nivelul sinapselor).

Perkel și Bullock (1968) au enumerat diferitele posibilități de codificare existente în sistemul nervos atît la nivel celular, cît și în ansamblurile de neuroni, găsind o varietate considerabilă. În ceea ce privește caracteristicile temporale ale impulsurilor, principalii parametri ce ar putea interveni sînt (fig. VI.11.):

— timpul de apariție al fiecărui impuls sau, ceea ce este echivalent, intervalul dintre impulsuri, acest tip de codificare corespunzînd în tehnică modulației de poziție;

— frecvența, adică numărul de impulsuri într-o unitate dată de timp, acest tip de codificare corespunzînd modulației de frecvență.

Într-o analiză devenită clasică a capacității maxime de transmitere a informației prin canalul neuronal, Mac Kay și Mac Culloch (1952) au estimat aceasta pe baza valorilor pe care le poate lua intervalul dintre impulsuri. Însă Terzuolo (1970) și grupul său (Mc Kean și colab., 1970) au arătat că parametrul cel mai semnificativ din punct de vedere fiziologic este frecvența. În estimările cantității de informație purtată de o secvență de impulsuri pe baza frecvenței, semnalele care apar cu diferitele probabilități p_i în formula (VI. 5.) sînt valorile pe care le ia frecvența. În principiu, o astfel de estimare constă din a măsura pentru un număr cît mai mare de intervale de timp frecvențele impulsurilor, a le grupa în funcție de valoare și a găsi probabilitățile de apariție a fiecărei valori. Cunoscînd aceste probabilități se

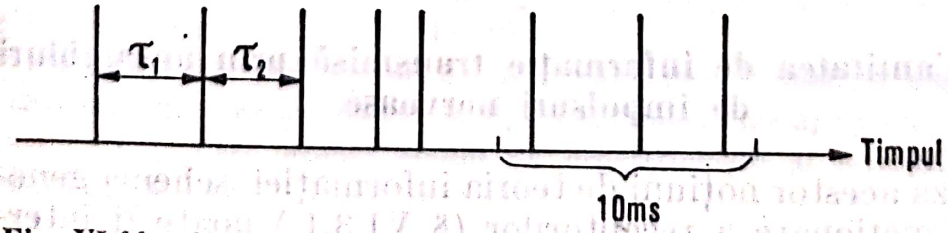


Fig. VI.11.: Parametrii unei secvențe de impulsuri nervoase (liniile verticale). Cu τ sînt notate intervalele dintre impulsuri. În intervalul de 10 ms considerat sînt 3 impulsuri, deci frecvența este 3×10^{-2} imp/s.

poate calcula informaţia transmisă prin canalul neuronal. Walløe (1970) a determinat transinformaţia adică debitul de informaţie transmisă de la fusurile neuromusculare către cerebel prin fibrele senzitive din tractul dorsal spino-cerebral, găsind valori în jur de 5 bit/s.

Griffith (1971), pe baza datelor lui Hertz şi colab. (1964), a calculat că prin fiecare fibră din nervul optic se pot transmite maximum 200 bit/s, creierul de om primind prin nervul optic o cantitate de informaţie de ordinul a 10^8 bit/s iar de la toţi receptorii aproximativ 10^9 bit/s. Utilitatea practică a acestui gen de estimări rezultă în primul rînd din punerea pe baze cantitative a proceselor psihofizice în vederea optimizării interacţiunii om-sisteme de comunicaţie şi în general a realizării unui ansamblu cît mai integrat om-sisteme tehnice de recepţie şi prelucrare a informaţiei.

VI.5. PROCESELE BIOFIZICE DE LA NIVELUL RECEPTORILOR

Mecanismul molecular prin care un stimul de o natură oarecare induce o variaţie de potenţial electric în celula receptoare este insuficient cunoscut pentru majoritatea receptorilor. Cu toată insuficienţa datelor actuale, se conturează însă concepţia conform căreia în toate procesele de acest fel sînt implicate, într-o formă sau alta, fenomene la nivelul membranelor.

VI.5.1. Ipoteze generale

Anterior s-a arătat că prima manifestare bioelectrică ce are loc în celulele receptoare sub acţiunea stimulului extern este apariţia potenţialului de receptor, care uneori se prezintă fuzionat cu potenţialul generator gradat. Deoarece biopotenţialele celulare apar, în general, ca urmare a unei variaţii a permeabilităţii membranei celulare pentru diferiţi ioni şi deci a unor fluxuri specifice de ioni prin membrană, eforturile de explicare a apariţiei potenţialului de receptor tind, în principal, să elucideze mecanismele prin care o forţă mecanică, cuante de energie radiantă sau contactul cu anumite molecule, ar putea produce variaţii ale permeabilităţii membranelor celulare.

Trebuie precizat însă faptul că, spre deosebire de potențialele de acțiune ale neuronilor despre care se știe cu certitudine că sînt o consecință a fluxurilor ionice transmembranare (§ III.3.2), este foarte posibil și chiar probabil ca potențialul de receptor să rezulte parțial din fenomene fizice mai directe, cum ar fi efecte fotoelectrice, piezoelectrice sau piroelectrice * în biopolimerii proteici care alcătuiesc structurile receptoare ce vin în contact cu stimulii. O serie de fapte tind să acrediteze această concepție.

Menționăm, astfel, dovezile certe că potențialul de receptor al conurilor și bastonașelor din retină provine direct din acțiunea luminii asupra pigmenților vizuali. Acest potențial nu are nici o latență sesizabilă și apare întotdeauna cînd rodopsina este intactă și adsorbită în mod orientat pe membranele discurilor din bastonașe, chiar dacă retina în ansamblu nu poate funcționa, fiind răcită pînă la —30°C, încălzită la 48°C sau tratată cu fixatori chimici (Wald, 1968).

De asemenea, în cadrul așa-numitului potențial microfonic cohlear, reprezentînd potențialul de receptor provenit de la celulele ciliate din organul lui Corti, există o componentă pur fizică, manifestată chiar după moartea animalului sau după oprirea locală a circulației sanguine. Această componentă pare a reprezenta un efect piezoelectric ce apare în momentul deformării prin deplasare a cililor de pe celulele ciliate. Există tentative recente de a explica în mod general funcționarea receptorilor mecanici și termici pe baza efectelor piezo- și piroelectrice din biopolimeri (Cope, 1973), dar acestea trebuie considerate pînă în prezent ca simple ipoteze cu o fundamentare mai mult speculativă și mai puțin experimentală.

În ceea ce privește termoreceptorii, generarea potențialului de receptor poate fi atribuită modificărilor induse de temperatură în dinamica reacțiilor biochimice care reglează starea terminațiilor nervoase. Pornindu-se de la aceasta, s-a elaborat ipoteza conform căreia funcționarea tuturor receptorilor ar depinde de un proces enzimatic (Duncan, 1967). Dacă ar fi într-adevăr așa, ar trebui ca temperatura

---

* Într-un semiconductor, așa cum sînt biopolimerii, efectul fotoelectric constă din mobilizarea sarcinilor electrice sub influența luminii. Efectele piezoelectric și piroelectric sînt caracteristice substanțelor cristaline și reprezintă apariția unei polarizări electrice ca urmare a acțiunii unei forțe mecanice și, respectiv, a unei variații de temperatură.

să influenţeze puternic relaţia dintre stimul şi răspuns şi pentru alţi receptori în afară de cei termici. Deoarece datele experimentale obţinute pe o serie de mecanoreceptori confirmă această presupunere, iar relaţiile matematice dintre intensitatea stimulului şi răspuns sprijină ideea că mecanismul de traducere depinde de un proces enzimatic, a fost propusă explicaţia conform căreia potenţialul de receptor ar apărea datorită activării de către stimuli a unui sistem enzimatic ATP-azic, localizat pe membranele celulelor receptoare. Mai mult chiar, în corpusculii Pacini se observă un strat de mitocondrii plasate chiar sub membrana receptorului, adică în mod adecvat pentru furnizarea ATP-ului necesar către acest sistem enzimatic. Însă, în cazul receptorilor gustativi ai vertebratelor, s-a demonstrat (Dastoli, 1970) că mecanismul iniţial al recepţiei gustative nu este de natură enzimatică, astfel încît ipoteza menţionată mai sus îşi pierde caracterul de generalitate.

În sfîrşit, o altă ipoteză recentă (Atema, 1973) porneşte de la similitudinile structurale dintre diferitele celule receptoare, considerînd că sistemul ciliar şi microtubular, practic omniprezent în acestea, este cel care primeşte informaţia din exterior şi o transmite către terminaţiile dendritice aferente, prin intermediul substanţei proteice din care sînt alcătuiţi microtubulii (tubulina). Diferiţii stimuli ar produce modificări conformaţionale în aceste macromolecule proteice, modificări ce se propagă sub forma unei unde prin agregatele de tubulină din care sînt constituiţi microtubulii. În acest mod modificările conformaţionale pot ajunge pînă la nivelul membranei dendritice unde, eventual, vor produce modificări de permeabilitate. Această ipoteză are şanse mari de veridicitate, deoarece modificări conformaţionale de genul celor presupuse a avea loc în tubulină sînt într-adevăr cunoscute în chimia macromoleculelor. Pînă în prezent, nu există însă indicaţii asupra incidenţei lor *in vivo* în microtubuli.

VI.5.2. Rolul membranelor în generarea potenţialelor de receptor

O explicaţie unitară, deşi încă incompletă, a apariţiei potenţialelor de receptor poate fi elaborată pe baza modificărilor produse de către stimuli în structura membranelor celulelor receptoare.

Scanned with OKEN Scanner

Astfel, generarea potențialului de receptor în receptorii gustativi și olfactivi, deci în chemoreceptori în general, poate fi atribuită producerii unor tranziții în conformația anumitor substanțe acceptoare existente pe membranele lor, atunci cînd acești acceptori leagă moleculele ce reprezintă stimulii.

Încă din 1954, L. M. Beidler a presupus că excitarea de către săruri a receptorilor gustativi se produce datorită adsorbției cationilor pe suprafața microvililor acestor celule. Pe baza constantei de asociere dintre moleculele stimul și celulele receptoare, el a estimat că legătura moleculei stimul cu molecula acceptor se face prin forțe foarte slabe a căror energie este de numai 1—2 kcal/mol. Pentru comparație, notăm că energia punții de hidrogen este de ≈4,5 kcal/mol.

Mai recent, Dastoli și colab. (1968) au extras din homogenat de suprafață linguală de bovine, iar apoi au caracterizat chimic o proteină cu masa moleculară de ≈ 150 000 u, care își modifică conformația în prezența fructozei și a altor zaharuri. Interacția se realizează și în acest caz prin forțe fizice slabe.

În contrast cu ipoteza existenței pe membranele receptorilor gustativi a unor molecule proteice cu rol de acceptori specializați, Kamo și colab. (1974) afirmă că stimularea receptorilor gustativi se datorează modificării de către moleculele stimul a potențialului de joncțiune de la interfața dintre membrana microvililor și soluția externă. Acest potențial depinde și de distribuția ionică și de sarcinile fixe din membrană. Un astfel de mecanism de stimulare poate, în principiu, să explice faptul că substanțe diferite, printre care chiar apa distilată, pot avea același gen de efect stimulant, dar este dificil să explice tocmai răspunsul specific la fiecare substanță-stimul.

În ceea ce privește recepția olfactivă, este un consens general că molecula odorantă realizează efectul de excitație prin legarea sa specifică de proteine acceptoare de pe membrana celulelor receptoare.

Efectul stimulilor mecanici asupra membranelor receptorilor ar putea consta atît din modificarea parametrilor electrici ai acestor membrane (rezistența, capacitatea), cît și din eliberarea anumitor agenți chimici legați de macromoleculele membranare. Ambele procese pot duce la o variație a potențialului transmembranar, deci la apariția potențialului de receptor. Faptul că anumite macromolecule și, în particular,

biopolimerii au proprietatea de a-şi modifica afinitatea chimică pentru diferite substanţe atunci cînd sînt supuşi la o tensiune mecanică este bine cunoscut şi reprezintă o bază pentru înţelegerea funcţionării mecanoreceptorilor (Katchalsky şi Oplatka, 1971).

În cazul electroreceptorilor de la peşti, cîmpul electric extern, chiar foarte slab, induce un moment de dipol în lanţurile macromoleculare lungi din cilii celulelor receptoare. Polarizarea indusă în ansamblul de macromolecule filiforme din cilii celulelor receptoare modulează un proces de amplificare capabil să determine variaţii de permeabilitate ale membranei celulelor ciliate, astfel că iau naştere curenţii ionici care stimulează fibrele nervoase aferente (Frey şi Eichert, 1972).

Receptorii vizuali, şi anume celulele cu bastonaşe, reprezintă pînă în prezent singurul exemplu de celulă receptoare la care a fost elucidată, în detaliu, succesiunea de procese moleculare prin care stimulul determină apariţia potenţialului de receptor, de aceea vom prezenta mai pe larg în subcapitolul VI.7 mecanisme ale excitării fotoreceptorilor. Mai înainte însă ne vom opri asupra problemelor biofizice ale durerii, aceasta reprezentînd un tip de informaţie senzorială de maximă importanţă pentru organisme şi constituind unul din semnele clinice fundamentale în patologie.

VI.6. DUREREA : TIPURI ŞI MECANISME DE RECEPŢIE

Durerea (suferinţa fizică) poate fi definită drept senzaţia pe care o produc acei stimuli ce lezează sau riscă să distrugă ţesuturile. Durerea este produsă în mod obişnuit de stimuli care la intensităţi mai mici evocă alte senzaţii (contacte mecanice, termice etc.), ceea ce complică şi mai mult eforturile de obiectivizare a unei experienţe senzoriale ce este prin însăşi natura ei tipic subiectivă. Caracteristicile senzaţiilor de durere sînt puternic influenţate de conştientizarea lor şi deci de afectivitate, dar durerea în sine este o modalitate senzorială proprie nu numai omului, ci şi animalelor, evidenţiabilă prin reacţii comportamentale specifice de „a scăpa" de agentul care o provoacă. În afara aspectelor neurofiziologice, legate de funcţionarea sistemului nervos central,

durerea ridică și probleme de biofizică senzorială, în ceea ce privește mecanismele de generare și conducere a excitațiilor specifice. Drept surse bibliografice generale pentru aceste probleme sînt: Knighton și Dumke (1966) și Mountcastle (1974).

VI.6.1. Caracterizarea senzațiilor de durere

După locul său de origine, durerea este de trei tipuri: 1) cutanată, provenind de la algoceptorii epidermici; 2) viscerală, provenind de la organele interne și 3) somatică profundă, provenind de la alte structuri ale corpului, în afară de viscere: mușchi, articulații, tendoane, periost.

Durerea cutanată, de exemplu aceea evocată de o înțepătură în braț sau în picior, constă din două senzații diferite, discriminabile temporal (§ VI.6.2): una acută ce apare brusc, numită durere primă, epicritică sau înțepătoare și alta ce se instalează mai lent și durează mai mult, numită durere secundă, protopatică sau arzătoare.

Atît durerea viscerală, cît și cea somatică profundă sînt senzații persistente, de intensități și grade de localizare variabile, dar fiind întotdeauna „surdă". În cazul viscerelor normale, neafectate de procese iritative sau inflamatorii, stimulii adecvați pentru durere par să fie presiunile și tensiunile exercitate pe zone largi, nu agenți localizați. Astfel, mucoasa intestinală normală este insensibilă la stimuli mecanici sau chimici moderați, dar atunci cînd este inflamată, chiar și stimuli mecanici ușori sau soluții diluate de acizi și baze evocă durerea surdă caracteristică bolilor intraabdominale. Tot în cazul viscerelor, de exemplu al vezicii urinare, durerea apare ca răspuns la contracția puternică a pereților musculari atunci cînd o obstrucție împiedică deplasarea normală a conținutului.

VI.6.2. Dolorimetria

Caracterul relativ al tuturor studiilor psihofizice și dificultatea standardizării rezultatelor provin din faptul că trebuie stabilită o corelație între două mărimi de naturi diferite: parametrul fizic obiectiv ce reprezintă stimulul

şi intensitatea senzaţiei — parametru subiectiv apreciat după declaraţia subiectului. Măsurarea intensităţii senzaţiilor de durere — dolorimetria sau algesiometria — este şi mai dificilă deoarece, înainte de a evoca aceste senzaţii, diferiţii stimuli excită receptorii altor modalităţi senzoriale. În plus de aceasta, peste senzaţia de durere se suprapun diferitele reacţii la durere, reacţii ce diferă foarte mult în funcţie de natura, durata şi intensitatea durerii, ca şi de vîrsta, sexul şi, mai ales, de personalitatea celui care suferă durerea.

Deşi subiecţii umani fie posedă, fie pot obţine prin antrenament capacitatea de a se concentra asupra durerii, astfel încît să o descrie ignorînd atît senzaţiile nedureroase, cît şi reacţiile la durere, rezultatele obţinute în acest mod nu pot fi transferate pentru cazul subiecţilor neantrenaţi. Încercările de a exprima cantitativ durerea produsă de o leziune sau de boală prin intermediul dozei de narcotice sau analgezice care reduc suferinţa pacientului — apreciată după declaraţii sau pe baza observării reacţiilor sale — oferă mai ales o măsură a eficacităţii terapeutice a respectivelor substanţe, mai mult decît o caracterizare a durerii în sine.

Cele mai riguroase determinări dolorimetrice au fost făcute de J. D. Hardy şi colaboratorii săi care au construit în anul 1940 un dolorimetru în care stimulul dureros este radiaţia termică. O lampă de infraroşii, alimentată potenţiometric pentru a-i putea regla debitul, trimite fasciculul de radiaţii printr-un sistem de colimare şi focalizare pe pielea frunţii subiectului, înnegrită pentru a face ca absorbţia de căldură să fie independentă de gradul de pigmentare naturală a pielii şi pentru a împiedica pătrunderea radiaţiilor infraroşii în straturile profunde. Energia radiantă primită de piele este dozată radiometric, iar temperatura pielii este măsurată cu un termistor.

Cu acest dolorimetru s-au determinat pragurile energetice ale durerii cutanate. Senzaţia de durere înţepătoare (epicritică) este produsă de o doză de 206 ± 21 mcal/s·cm^2, iar pentru durerea arzătoare (protopatică) pragul este cu 20—40 mcal/s·cm^2 mai mic şi rezultatele sînt mai dispersate între diferiţii subiecţi. Şi durerea surdă, de origine profundă, poate fi produsă de radiaţia termică, dar numai atunci cînd aceasta este suficient de intensă pentru a ridica temperatura ţesuturilor profunde. Pragul pentru acest tip de durere este de 300—320 mcal/s·cm^2.

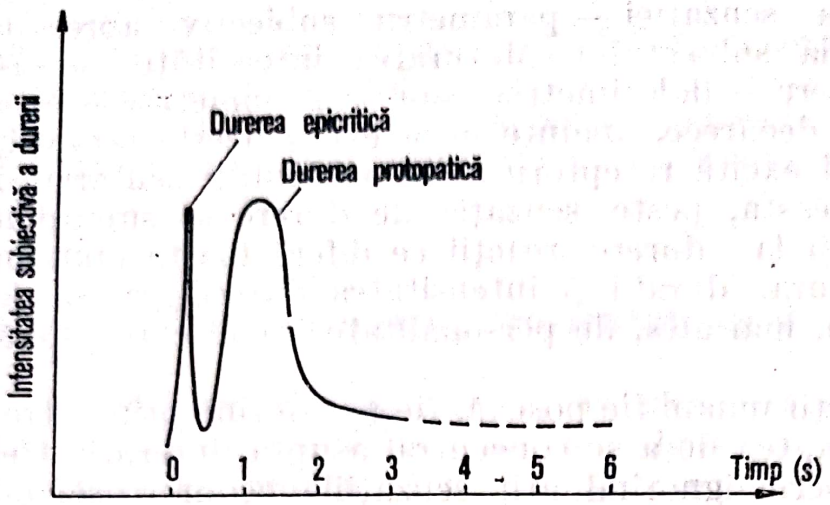


Fig. VI.12. : Diagramă a evoluţiei dublei dureri la o înţepătură.

Există un fenomen de adaptare la durere, în sensul că o stimulare persistentă de intensitate constantă duce la o scădere treptată şi eventual chiar la dispariţia durerii. Lucrîndu-se cu stimuli mecanici (ace fine), reci (zăpadă carbonică) sau fierbinţi (energie radiantă), menţinuţi constanţi, s-a constatat că în toate cazurile durerea, după ce a trecut prin cele două stadii, scade pînă la dispariţie (fig. VI.12), lăsînd în urmă senzaţiile corespunzătoare de presiune, rece sau cald.

VI.6.3. Recepţia şi conducerea senzaţiilor de durere

Faptul că durerea poate fi produsă de stimularea intensă a oricărui organ de simţ a sugerat că ea ar fi doar rezultatul suprastimulării senzoriale. În prezent există însă dovezi convingătoare că senzaţiilor de durere le corespunde un sistem propriu de receptori şi de fibre nervoase, constituind aferenţele nociceptive. Astfel, durerea datorită luminii orbitoare nu apare în sistemul vizual, ci provine de la aferenţele nociceptive din muşchii oculari, iar tonurile stridente produc durerea pe calea unor aferenţe nociceptive din cavităţile urechii externe şi medii, nu prin suprastimularea nervului auditiv. Alături de absenţa unui stimul specific pentru durere, confuzia a fost întreţinută şi de faptul că algoceptorii sînt răspîndiţi aproape peste tot în corp.

Pornind de la observaţia că în cornee, care este sensibilă la durere, nu există decît terminaţii nervoase libere,

neîncapsulate şi nemielinizate, Von Frey le-a atribuit acestora rolul de algoceptori. Într-adevăr, terminaţiile libere (în formă de ghem, butoni, ramuri fine ce formează reţele prin anastomozare) sînt singurul tip de receptori suficient de răspîndiţi pentru a servi ca algoceptori. În piele, zonele cele mai bogate în astfel de terminaţii sînt în vecinătatea cavităţilor corpului ca, de exemplu, pliurile conductului auditiv extern, iar în viscere sînt plexurile vasculare.

Corespunzător celor două tipuri de durere cutanată descrise anterior, sînt şi două grupuri de aferenţe nociceptive. Astfel, deşi este probabil ca la nivelul receptorilor, excitaţiile corespunzătoare durerii rapide (epicritică) şi celei lente (protopatică) să apară simultan, ele sînt conduse cu viteze diferite de către două tipuri de fibre nervoase : fibrele mielinizate din grupul Aδ, avînd diametre între 3 şi 6 μm, conduc cu viteză mare excitaţia primă, iar fibrele subţiri, amielinice din grupul C, avînd diametrele sub 1 μm, conduc mai lent excitaţia secundară. În favoarea acestei interpretări pledează, printre altele, şi următoarele argumente simple : a) dacă stimulul dureros nu este aplicat la o extremitate a corpului, ci în regiunea medială a trunchiului, deci dacă drumul pînă la centrii nervoşi medulari este scurt, cele două forme de durere fuzionează, separarea temporală fiind foarte mică; b) cocaina — care în nervii micşti inhibă iniţial conducerea prin fibrele subţiri nemielinizate — aboleşte mai întîi durerea secundară, lentă.

Înţelegerea mecanismului de transducţie periferică a stimulilor dureroşi este de mare importanţă medicală căci condiţionează elaborarea de agenţi terapeutici pentru controlul durerii, agenţi a căror acţiune să fie limitată şi localizată la punctul de origine al acesteia. S-a pus mult timp problema dacă terminaţiile aferenţelor nociceptive sînt excitate direct de către stimulii noxici sau dacă excitaţia acestora este produsă de anumite substanţe eliberate în urma lezării celulelor. Cele mai multe dovezi experimentale sprijină această idee, astfel încît în prezent se consideră că algoceptorii sînt nişte chemoreceptori de tip particular.

O indicaţie clară în acest sens a decurs chiar din măsurătorile dolorimetrice ale grupului lui J. D. Hardy. Astfel, urmărindu-se dependenţa dintre temperatura iniţială a pielii şi transferul de radiaţie necesar pentru atingerea pragului de durere epicritică, s-a constatat că durerea este produsă de acei stimuli care, dacă ar fi prelungiţi, ar face ca tempera-

tura pielii să devină 45°C. Deși pragul energetic al durerii epicritice variază de la o zonă la alta pe suprafața corpului, în orice punct testat temperatura finală a pielii este în jur de 45°C. Ținînd seama și de faptul că durerea apare spontan la 44—45°C, indiferent de temperatura anterioară a pielii și că, prin menținerea mai multe ore, la această temperatură se produce necroza epidermei, se impune concluzia că algoceptorii sînt excitați într-un stadiu precoce al unui proces a cărui continuare duce la moartea celulară. Acest proces este ruperea lizozomilor, urmată de eliberarea în fluidul intercelular a unor enzime proteolitice care acționează asupra γ-globulinelor, producînd o serie de polipeptide cu mare capacitate vasodilatatoare și iritantă. În perfuzatul spațiilor subcutanate apar, după lezarea pielii, o enzimă proteolitică și polipeptidul neurochinină, foarte asemănător cu bradichinina și care produce vasodilatație și durere chiar în concentrații foarte mici. Atît în fluidul din veziculele apărute pe piele în urma lezării acesteia, cît și în exudatele altor țesuturi dureroase, este prezentă bradichinina, aceasta fiind, alături de serotonină și histamină, printre substanțele cu cea mai mare capacitate de a produce durerea.

În rezumat deci, se poate spune că stimulii noxici de orice tip evocă durerea datorită capacității lor de a leza celulele. În urma lezării, se eliberează din celule o enzimă proteolitică ce formează din globulinele fluidului extracelular o serie de polipeptide care excită terminațiile aferențelor nociceptive.

Fără să ne oprim asupra căilor de transmitere a senzațiilor de durere în sistemul nervos central, menționăm în contextul mecanismelor celulare ale excitației algice, descoperirea în ultimii ani a unor substanțe ce par să fie implicate în transmisia și modularea acestui tip de excitație între neuronii din creier. Astfel, Simon și colab. (1973), ca și alte grupuri de cercetare, au descoperit că creierul tuturor vertebratelor examinate, în particular al omului, are capacitatea de a lega cu mare afinitate substanțe opiacee de tipul morfinei. Este vorba deci de existența unei molecule cu rol de receptor, al morfinei, localizată pe membranele neuronale (Simon și colab., 1975). În creierul uman, receptorii pentru morfină au maximum de abundență în acele zone pe unde trec mesajele senzoriale de la aferențele nociceptive, adică în sistemul limbic și în substanța cenușie din jurul apeductului lui Sylvius, la fel ca și în substanța gelatinoasă din măduva spinării.

Semnificaţia acestor receptori pentru morfină — substanţă cu care organismele nu sînt în mod natural în contact — a devenit mai clară atunci cînd s-a descoperit existenţa în creier a unor pentapeptide cu acţiune morfinomimetică (Hughes şi colab., 1975) numite *endorfine*, adică substanţe endogene cu acţiuni asemănătoare cu acelea pe care le exercită morfina. Deşi rolul endorfinelor nu este încă precizat, descoperirea lor aduce studiul mecanismelor centrale ale durerii în etapa cercetărilor de biologie moleculară.

VI.7. MECANISMELE FOTORECEPŢIEI

Recepţia luminii, adică a radiaţiilor electromagnetice dintr-un anumit domeniu de lungimi de undă (pentru om: 400—700 nm) este una dintre modalităţile senzoriale fundamentale, poate chiar cea mai importantă pentru orientarea vieţii organismelor, deoarece permite explorarea de la distanţă şi obţinerea celei mai mari cantităţi de informaţie despre mediul extern. În acest subcapitol vom analiza mai pe larg fotorecepţia, atît datorită semnificaţiei sale deosebite în ansamblul recepţiei senzoriale, cît şi fiindcă acesta este cazul concret în care mecanismele biofizice sînt cel mai bine elucidate, permiţînd ilustrarea în detaliu a principiilor generale discutate anterior.

Primele studii ale fotorecepţiei la organismele pluricelulare se asociază cu existenţa unei fotosensibilităţi a celulelor epidermice (sensibilitate dermatoptică) ce permite numai o discriminare grosieră a intensităţii şi direcţiei fluxului de lumină. Astfel de celule senzoriale epidermice posedă de exemplu celenteratele, moluştele, larvele insectelor. Celulele fotoreceptoare specializate sînt cel mai adesea asociate cîte mai multe şi împreună cu structuri anexe avînd atît rol de protecţie, cît şi de dirijare a energiei stimulilor luminoşi, formînd organe vizuale. Indiferent de anatomia concretă a organului vizual, formaţiunile anexe sînt: celule pigmentate care împiedică sosirea luminii din toate direcţiile, medii refringente care concentrează şi dirijează radiaţiile şi sisteme de reglare a fluxului luminos.

Perceperea formelor, deci vederea imaginilor, este realizată de către două tipuri fundamental diferite de organe vizuale (fig. VI.13.):

— ochiul compus (sau cu faţete) de la insecte, crustacee şi unele moluşte, format din numeroase omatidii separate

din punct de vedere optic, fie complet (dînd imagini parțiale pe care sistemul nervos le alătură), fie incomplet (dînd imagini care se suprapun);

— ochiul camerular, avînd celulele receptoare pe fața internă a unei vezicule, acolo unde sînt proiectate imaginile răsturnate ale obiectelor. Cefalopodele, artropodele și vertebratele posedă ochi cu cristalin, forma cea mai evoluată a ochiului camerular.

Deși se compun din aceleași tipuri de formațiuni, între ochiul de cefalopode și cel de vertebrate sînt mari deosebiri

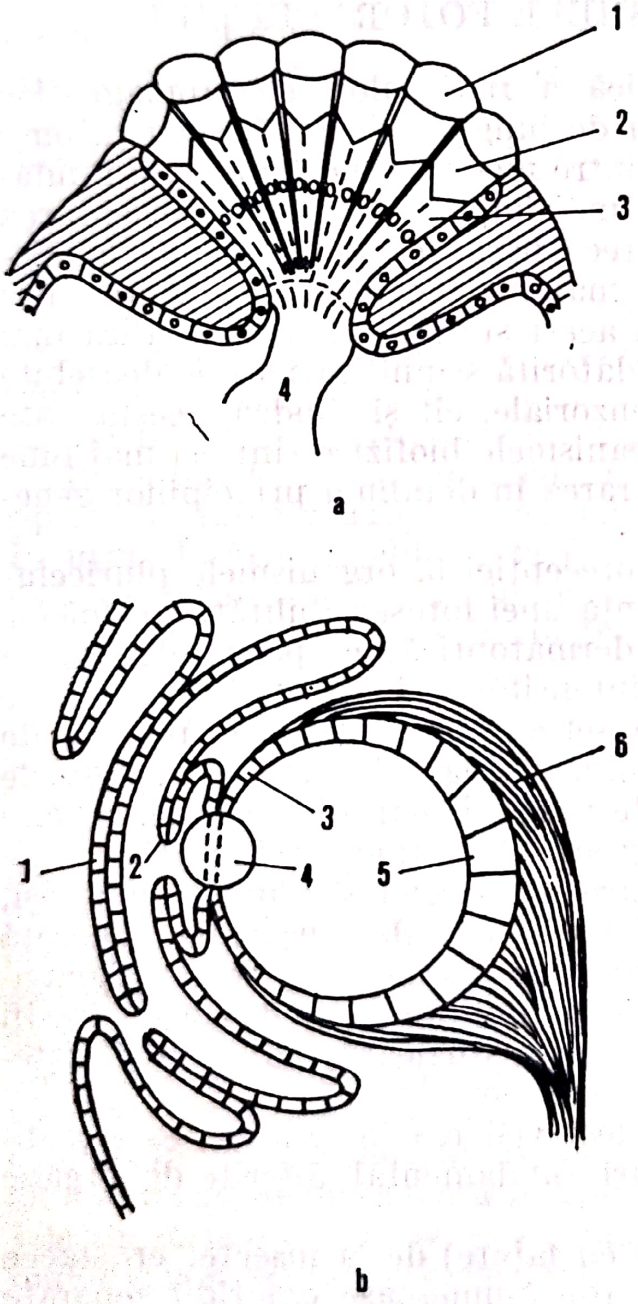


Fig. VI.13.: Cele două tipuri principale de organe vizuale, reprezentate schematic. *A* — ochi compus de insecte: 1 — cornee, 2 — cristalin, 3 — celulă senzitivă, 4 — lobul optic al ganglionului cerebroid. *B* — ochi camerular de cefalopode: 1 — cornee, 2 — iris, 3 — proces ciliar, 4 — cristalin, 5 — retină, 6 — nerv optic.

morfologice. Astfel, la cefalopode retina constă dintr-un singur strat, iar celulele senzoriale sînt îndreptate cu polul receptor către exterior, în timp ce la vertebrate retina constă din mai multe straturi, iar celulele senzitive sînt orientate cu polul receptor în sens opus faţă de lumina incidentă.

VI.7.1. Structura fotoreceptorilor la vertebrate

Fără să ne mai referim la anatomia globului ocular şi la funcţiile diferitelor sale componente, menţionăm doar că lumina traversează o succesiune de medii transparente: corneea, umoarea apoasă, cristalinul şi umoarea sticloasă, înainte de a ajunge pe retină. Din punct de vedere optic, efectul de refringenţă al tuturor acestor medii este echivalent cu cel al unei lentile convergente de 60 dioptrii, care face ca imaginile obiectelor din exterior să se formeze pe retină.

Retina poate fi considerată drept o expansiune periferică a creierului, deoarece:

1) din punct de vedere embriologic provine dintr-o excrescenţă cavitară a diencefalului (vezicula optică),

2) în afara celulelor fotoreceptoare, conţine şi două etaje succesive de neuroni senzitivi (celulele bipolare şi celulele ganglionare), precum şi celulele amacrine care conectează „pe orizontală" teritorii uneori îndepărtate, deci,

3) retina este sediul unor procese ample de prelucrare a informaţiei primare din fotoreceptori.

În fig. VI.14. sînt reprezentate schematizat cele 10 straturi ale retinei pentru a ilustra conexiunile elementelor receptoare cu protoneuronii şi deutoneuronii vizuali, adică respectiv, cu celulele bipolare şi ganglionare.

În total, în retina umană sînt $(6-7) \times 10^6$ conuri şi peste 100×10^6 bastonaşe, distribuite neuniform: în fovea centrală sînt numai conuri, iar spre periferia retinei scade numărul acestora şi devin tot mai abundente bastonaşele. Bastonaşele au pragul de excitaţie minim, putînd fi excitate de un singur foton absorbit, dar nu permit vederea colorată, în timp ce conurile au un prag mai ridicat, dar permit sesizarea lungimii de undă a radiaţiei, adică a culorii. Conurile sînt deci receptorii pentru vederea diurnă (fotopică) iar bastonaşele pentru vederea nocturnă (scotopică). În fovee fiecare celulă cu con face sinapsă cu un singur protoneuron, conectat la rîndul său cu un singur deutoneu-

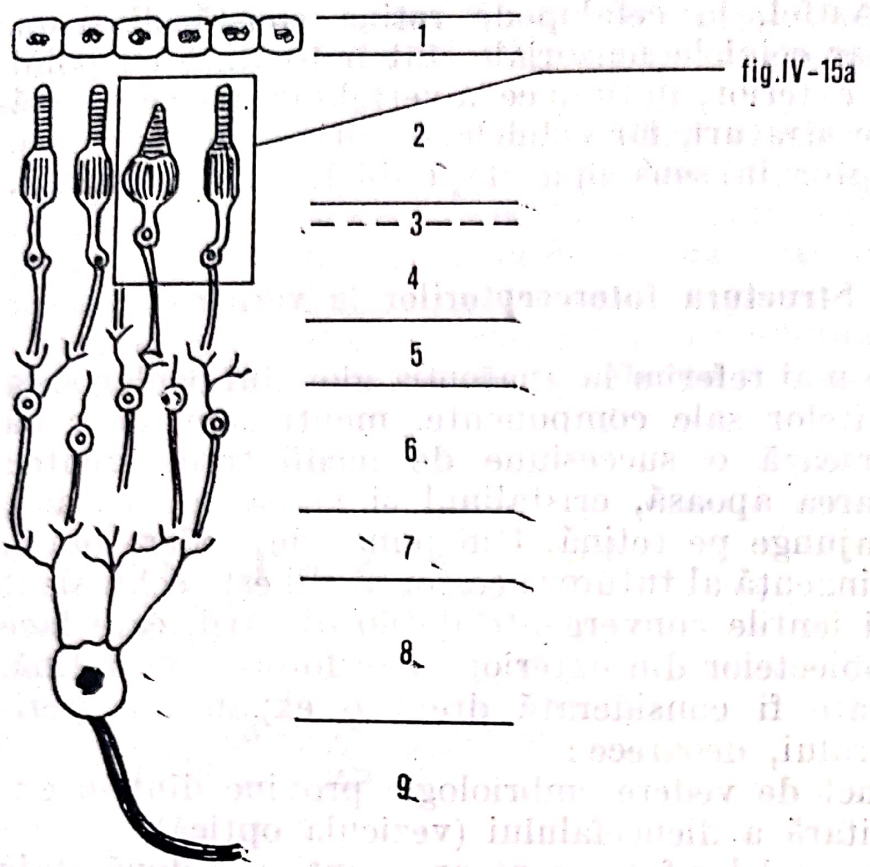


Fig. VI.14. : Straturile retinei. 1 — zona pigmentară, 2 — conuri şi bastonaşe, 3 — membrana limitantă externă, 4 — stratul granulos extern, 5 — stratul plexiform extern, 6 — stratul granulos intern, 7 — stratul plexiform intern, 8 — corpii celulelor ganglionare, 9 — fibrele nervului optic.

ron, în timp ce spre periferie numeroase celule cu bastonaşe fac sinapsă cu un acelaşi protoneuron, iar mai mulţi protoneuroni sînt conectaţi cu acelaşi deutoneuron. Este clar deci că dimensiunile cîmpurilor receptive sînt foarte diferite.

Celulele fotoreceptoare sînt tot de origine neuronală, avînd însă conurile şi bastonaşele ca formaţiuni specifice pentru captarea fotonilor incidenţi. Atît conurile cît şi bastonaşele au cîte un segment extern şi unul intern (fig. VI.15.a.) unite între ele prin cîte o tulpină ciliară. În segmentele externe sînt discuri din membrane duble aşezate unele peste altele şi care provin din invaginarea membranei externe. Discurile de la bastonaşe sînt libere şi separate de membrana externă, iar cele de la conuri sînt în continuitate unul cu altul şi cu membrana plasmatică. În ambele cazuri, această structură face să existe o suprafaţă membranară foarte mare. Astfel, la broască într-un bastonaş sînt aproximativ

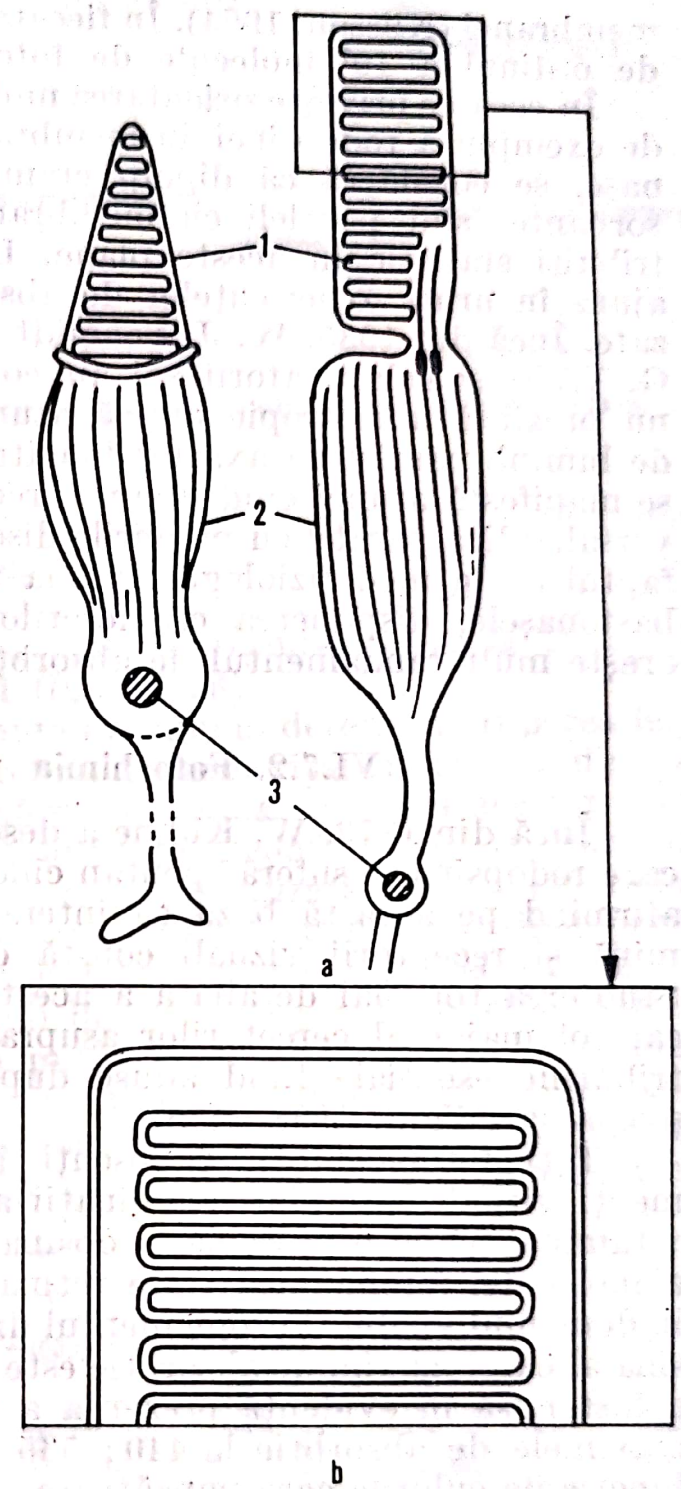


Fig. VI.15.: Schema fotoreceptorilor cu conuri şi bastonaşe (*a*): 1 — segmentele externe, 2 — segmente interne, 3 — nuclee. În (*b*) este mărită o porţiune din segmentul extern al bastonaşului pentru a arăta discurile membranare separate de membrana externă.

1900 discuri, cu o suprafaţă totală de 150 000 μm^2 (Nilsson, 1965). În preparate fixate cu osmiu, membrana discurilor se prezintă ca fiind organizată în subunităţi globulare cu distanţa dintre centre de 50 Å, în fiecare subunitate găsindu-se o moleculă de fotopigment care deci face parte din structura

membranei (Nilsson, 1964). În fiecare bastonaş sînt un număr de ordinul a 10^7 molecule de fotopigment.

În ceea ce priveşte orientarea moleculelor de fotopigment, de exemplu a rodopsinei în membrana discurilor din bastonaşe, se consideră că dipolii cromoforilor (părţile fotoabsorbante) sînt paraleli cu membranele discurilor, dar distribuiţi statistic în aceste plane. La această concluzie s-a ajuns în urma experienţelor de absorbţie a luminii polarizate. Încă din 1935, W. J. Schmidt a constatat, iar în 1963 G. Wald şi colaboratorii săi au confirmat, că bastonaşele nu prezintă anizotropie optică atunci cînd sînt traversate de lumină paralel cu axa lor longitudinală, dar anizotropia se manifestă atunci cînd lumina trece prin bastonaşe transversal, adică paralel cu planurile discurilor. Ţinînd seama de faptul că în mod fiziologic lumina traversează longitudinal bastonaşele, dispunerea cromoforilor în planul discurilor creşte mult randamentul de absorbţie a luminii.

VI.7.2. Fotochimia vederii

Încă din 1879, W. Kühne a descris o serie de reacţii pe care rodopsina le suferă spontan cînd este expusă la lumină, afirmînd pe această bază că interacţia primară dintre lumină şi receptorii vizuali constă din reacţii fotochimice. Studierea tot mai detaliată a acestor reacţii a devenit un capitol major al cercetărilor asupra recepţiei vizuale, contribuţiile esenţiale fiind aduse după 1935 de G. Wald şi şcoala sa (Wald, 1968 a; b).

Toţi fotoreceptorii cunoscuţi în prezent conţin pigmenţi vizuali care sînt combinaţii ale retinalului (aldehida vitaminei A) cu o proteină — opsina. Partea fotoabsorbantă a moleculei (cromoforul) este retinalul, opsina neabsorbind în domeniul vizibil. Fotopigmentul din bastonaşe este rodopsina al cărei maxim de absorbţie este la 498 nm, iar în conuri a fost pusă în evidenţă prezenţa a trei fotopigmenţi avînd maximele de absorbţie la 440; 535 şi 620 nm şi numiţi în funcţie de culorile corespunzătoare acestor lungimi de undă, respectiv: cianolab, clorolab şi eritrolab. Deoarece, aşa cum am spus anterior, în toţi pigmenţii vizuali partea fotoabsorbantă este izomerul 11-*cis* al aldehidei vitaminei A, diferenţele dintre spectrele de absorbţie se datorează naturii specifice a legăturilor dintre această grupare prostetică şi opsină.

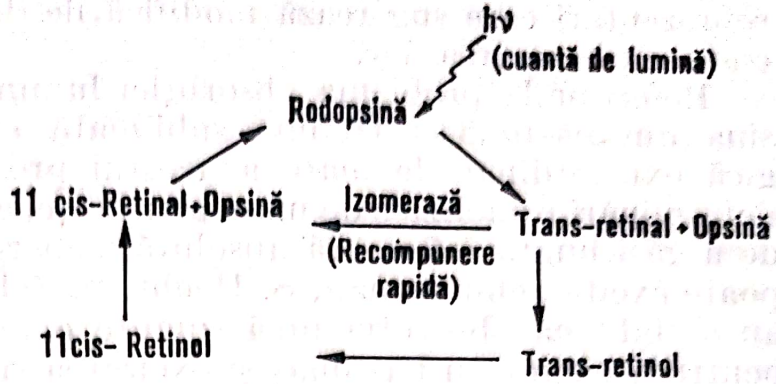


Fig. VI.16. : Ciclul lui Wald simplificat conţinînd principalele etape ale descompunerii şi reformării rodopsinei.

Bazele moleculare ale excitaţiei vizuale sînt cunoscute în detaliu la bastonaşe, pentru rodopsină fiind descris ciclul de transformări prin care aceasta este descompusă de către cuantele de lumină şi apoi se resintetizează la întuneric, numit ciclul lui Wald (fig. VI.16).

Absorbţia unei cuante de lumină determină ruperea legăturii dintre opsină şi retinal şi izomerizarea acestuia din conformaţia 11-*cis* în conformaţie *trans*. În urma acestor transformări se produce o modificare a conformaţiei porţiunii din membrana discului pe care este localizată molecula de rodopsină ce a fost descompusă, această modificare fiind primul efect al interacţiei stimulului cu structura receptoare.

În cadrul procesului de fotoliză a rodopsinei şi izomerizare a retinalului, au putut fi identificate mai multe etape intermediare, lucrîndu-se la temperaturi scăzute şi urmărind spectrele de absorbţie ale reactanţilor. În fig. VI.17. sînt enumeraţi patru dintre produşii intermediari, în cadrul une

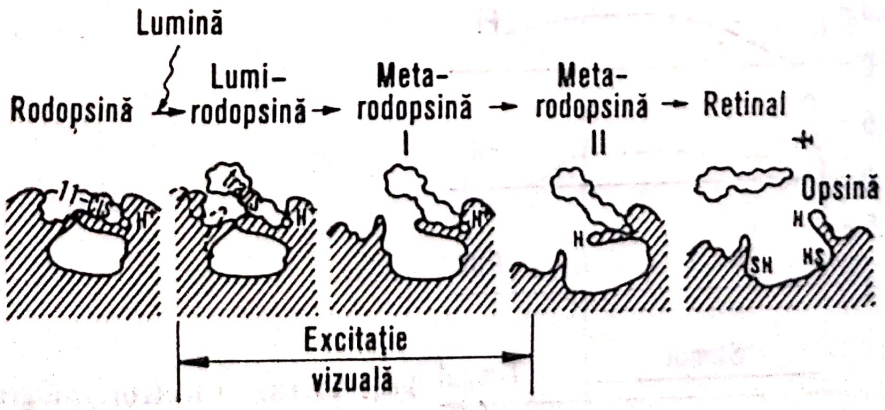


Fig. VI.17. (după Arden, 1969) : Etapele şi intermediarii în procesul descompunerii rodopsinei de către lumină.

reprezentări care sugerează modificările de conformație asociate cu formarea lor.

Referitor la problema absorbției luminii de către rodopsina din bastonașe, trebuie subliniată eficacitatea fiziologică extraordinar de mare a acestui proces. În 1942, prin determinări psihofizice de mare acuratețe, efectuate în scopul de a găsi limita inferioară absolută a energiei luminoase care poate excita ochiul uman, S. Hecht, S. Schlaer și M. Pirenne au stabilit că absorbția unei singure cuante este suficientă pentru a excita un bastonaș și excitarea simultană a aproximativ 6 bastonașe permite detectarea unei surse de lumină.

VI.7.3. Biopotențialele fotoreceptorilor

Primele tentative de a evidenția activitatea electrică asociată cu funcționarea retinei au fost făcute de Du Bois—Reymond, dar numai după 1930 a devenit posibilă înregistrarea ansamblului de variații de potențial ale diferitelor celule retiniene.

Pentru înregistrarea electroretinogramei (ERG), un electrod este pus în contact cu corneea, celălalt fiind implantat la nivelul ieșirii nervului optic, la animalul de experiență, sau plasat pe regiunea frontală sau temporală, la om. Ca răspuns la un stimul luminos în treaptă, de valoare ridicată, ERG are aspectul reprezentat în fig. VI. 18. În cadrul acestui

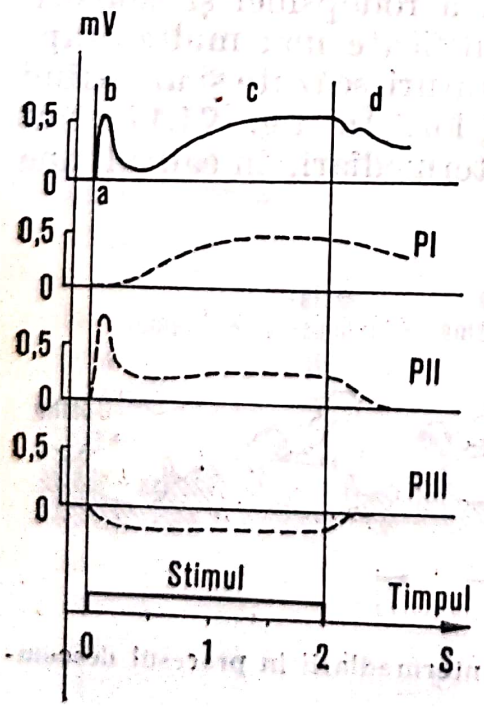


Fig. VI.18. : Electroretinograma produsă de un stimul luminos intens constînd din undele *a*, *b*, *c* (răspuns ON) și *d* (răspuns OFF) și cele trei componente ale sale.

traseu complex, R. Granit a putut să separe prin diferite procedee (anoxie, anestezie) trei componente, undele P I, P II şi P III, din a căror suprapunere rezultă ERG. Implantînd apoi microelectrozi la diferite nivele în retină, s-a stabilit că :

— unda P I provine de la epiteliul pigmentar ;

— unda P II ia naştere la nivelul sinapselor între fotoreceptori şi celulele bipolare ;

— numai unda P III ia naştere la nivelul fotoreceptorilor, exprimînd potenţialele de receptor ale conurilor şi bastonaşelor.

H. Hartline a înregistrat încă din 1952 potenţialul de receptor al unei singure celule receptoare din ochiul compus al crabului *Limulus* arătînd că impulsurile nervoase sînt precedate de o depolarizare a celulei receptoare în mod lent şi proporţional cu intensitatea luminoasă. Deoarece retina vertebratelor conţine numeroase straturi compacte de celule mici, greu de pătruns, înregistrarea electrică a potenţialelor de receptor ale bastonaşelor şi conurilor a fost posibilă numai după 1964, cînd T. Tomita a reuşit să introducă microelectrozi cu vîrful de 0,1 μm în cîte o singură celulă receptoare (Tomita, 1970), imprimînd preparatului acceleraţii mari prin vibraţii pe distanţe de numai cîţiva microni.

Un prim rezultat a fost evidenţierea electrofiziologică în cadrul retinei de crap a trei populaţii de conuri diferind după lungimea de undă la care potenţialul de receptor are valoarea maximă : 16% din receptorii studiaţi au răspunsul maximal la 462 nm, 10% la 529 nm şi 74% la 611 nm. Concordanţa foarte bună cu spectrele de absorbţie ale conurilor confirmă existenţa în retină a trei tipuri de conuri sensibile la lungimi de undă diferite.

În ceea ce priveşte amplitudinea potenţialului de receptor, Tomita a constatat că pentru valori mici ale intensităţii luminii se respectă dependenţa logaritmică ce caracterizează majoritatea receptorilor. Extrapolînd această dependenţă, el a calculat că răspunsul electric corespunzător unei singure cuante va fi de cîţiva microvolţi.

O caracteristică aparent stranie a potenţialului de receptor al conurilor şi bastonaşelor de la vertebrate este sensul său invers faţă de ceilalţi receptori. Astfel, în timp ce la nevertebrate iluminarea produce o depolarizare a membranei externe a celulei fotoreceptoare, datorită creşterii influxului pasiv de sodiu, la conurile şi bastonaşele vertebratelor se

produce o hiperpolarizare a membranei. Astfel, dacă la întuneric interiorul bastonaşului este la un potenţial negativ de 10—20 mV faţă de exterior, după iluminare această diferenţă creşte cu valori pînă la 15 mV. Hiperpolarizarea se datoreşte unei scăderi a permeabilităţii pentru sodiu a membranei. Hagins şi colab. (1970) au explicat hiperpolarizarea prin excitarea bastonaşelor, constatînd existenţa în stare de repaus a unui curent „de întuneric" ce constă dintr-un flux de sodiu pompat activ în afara celulei în porţiunea segmentului intern şi care intră pasiv prin membrana segmentului extern (fig. VI.19.). Lumina reduce curentul de întuneric scăzînd permeabilitatea pentru sodiu a membranei segmentului extern, adică închizînd o parte din canalele prin care sodiul pătrunde în mod pasiv. Pentru un singur foton absorbit, curentul prin membrana fotoreceptorului variază (scade) cu 1%, adică dintr-un total de aproximativ 1000 canale pentru sodiu, se închid în jur de 10.

Hagins (1972), apoi Bonting şi Daemen (1974) au explicat modul în care fotoliza unei molecule de rodopsină de pe membrana discurilor poate să producă închiderea a 10 canale ale sodiului de pe membrana externă la o distanţă în jur de 250 Å, punînd în evidenţă rolul calciului de mediator între cele două membrane. În stare de repaus (la întuneric), calciul este reţinut în interiorul discurilor prin activitatea pompelor specifice din membrana acestora, concentraţia de Ca^{2+} în citoplasmă fiind foarte mică. Descompunerea rodopsinei eliberează în citoplasmă ioni de calciu, aceştia difuzînd pînă la membrana externă unde blochează canalele sodiului (fig. VI.19.). Variaţia curentului de întuneric produsă de un singur foton se poate propaga pînă la sinapsa elementului receptor cu celula bipolară corespunzătoare, datorită proprietăţilor de cablu ale membranei externe.

În afara potenţialului de receptor, al cărui mecanism l-am prezentat, Brown şi Murakami (1964) au pus în evidenţă încă o manifestare electrică ce apare în conuri şi bastonaşe ca rezultat al iluminării : potenţialul precoce de receptor — — PPR. PPR apare practic fără latenţă (mai mică de 0,5 μs), are o intensitate foarte mică şi variază direct proporţional cu intensitatea stimulului, nu cu logaritmul acesteia. Singura condiţie indispensabilă apariţiei PPR în bastonaşe este ca rodopsina să fie intactă şi orientată pe membranele discurilor, astfel că PPR se produce chiar în retine îngheţate la —30°C, fixate cu glutaraldehidă sau plasate în soluţii cu

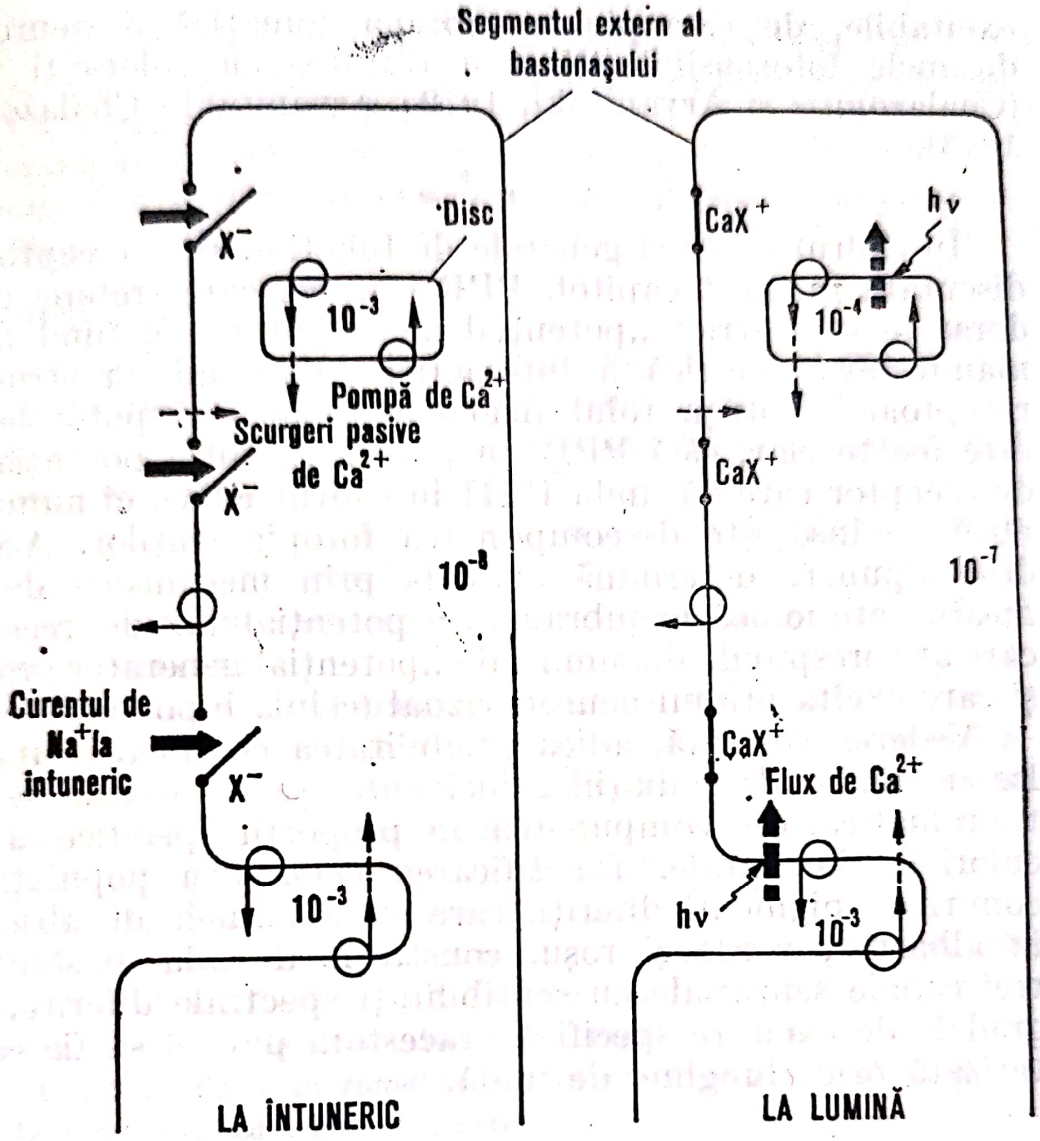


Fig. VI.19. (după Hagins, 1972) : Mecanismul excitării fotoreceptorilor vertebratelor de către cuantele de lumină. Cuantele de lumină (hν) determină intrarea Ca^{2+} în spaţiul dintre discuri, astfel închizîndu-se canalele prin care circulă curentul ,,de întuneric'' al sodiului şi apărînd o hiperpolarizare a membranei segmentului extern. Valorile înscrise în interiorul discului, în bastonaş şi în afară, exprimă ordinul de mărime al concentraţiei calciului.

mult potasiu şi fără sodiu. Toate acestea arată că PPR nu provine din curenţi ionici datoraţi unor fenomene de membrană. Ţinînd seama şi de faptul că PPR variază cu temperatura similar cu reacţiile fotochimice, se impune concluzia că el reprezintă un efect fotovoltaic, de transfer intramolecular de sarcini electrice în interiorul pigmenţilor în momentul fotolizei lor.

Este interesant de notat că efecte fotovoltaice, de tipul PPR al fotoreceptorilor, au fost obţinute şi cu alte membrane

excitabile, de exemplu membrana somatică a neuronilor de melc fotosensibilizați prin tratarea cu coloranți vitali (Chalazonitis și Arvanitaki, 1972; Arvanitaki—Chalazonitis, 1973).

* * *

În cadrul schemei generale de funcționare a receptorilor, discutată în acest capitol, PPR este cel care trebuie considerat în sens strict „potențial de receptor", el fiind prima manifestare electrică a interacției stimulului cu structura receptoare. Totuși, rolul fiziologic al acestui potențial nu este foarte clar, căci PPR nu pare a fi cauza potențialului de receptor care dă unda P III în cadrul ERG, ci numai un efect ce însoțește descompunerea fotopigmenților. Această descompunere determină apariția prin mecanisme de permeabilitate ionică membranară a potențialului de receptor, care ar corespunde denumirii de „potențial generator gradat" și care excită primul neuron vizual (celula bipolară).

Vederea colorată, adică posibilitatea codificării lungimilor de undă ale radiațiilor incidente, se realizează pe cale tricromatică, din compunerea în proporții specifice a trei culori fundamentale. Identificarea celor trei populații de conuri cu pigmenți diferiți, care au maximele de absorbție în albastru, verde și roșu, constituie dovada existenței a trei canale senzoriale cu sensibilități spectrale diferite, prin gradele de excitare specifică a acestora putînd să fie caracterizată orice lungime de undă.

BIBLIOGRAFIE

A. Referințe generale

Cea mai completă sursă de date asupra funcționării analizatorilor este ciclul de 8 volume: *Handbook of Sensory Physiology* (Springer, Berlin, 1971—1973). Dintre acestea, pentru problemele generale ale receptorilor, menționăm vol. 1: LOEWENSTEIN, W. R. (ed.) (1971), *Principles of Receptor Physiology*, Springer, Berlin.

* * *

AIDLEY, D. J. (1971), *The Physiology of Excitable Cells*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.

BURGEAT, M., GRALL, Y., LOTH, D. (1973), *Biophysique sensorielle*, Masson, Paris.

CAPITOLUL VII

APLICAŢII ŞI PERSPECTIVE ALE NEUROBIOFIZICII

Revenind, la sfîrşitul acestei lucrări, asupra domeniului ştiinţific interdisciplinar pe care l-am circumscris sub numele de *neurobiofizică*, putem afirma pe baza problemelor expuse în capitolele precedente, că obiectivul său general îl constituie descifrarea celor mai profunde mecanisme ale funcţionării sistemului nervos. Aceste mecanisme fundamentale se situează în mod evident la nivel celular şi subcelular, dar din integrarea lor specifică pe ansamblul sistemului nervos rezultă funcţiile macroscopice ale acestuia.

Datorită complexităţii intrinseci a problemelor de biofizică a celui mai perfecţionat subsistem al organismului (sistemul nervos), dar mai ales a multitudinii şi diversităţii problemelor în care neurobiofizica este direct implicată, este foarte dificil să fie asamblate în mod unitar toate aplicaţiile şi implicaţiile sale. Astfel, pentru fiziologie prezintă mare interes modul în care de la procesele de nivel neuronal se trece la funcţiile integrative ale sistemului nervos, pentru patologie este importantă originea manifestărilor clinice, precum şi posibilitatea stabilirii de metode precise de diagnostic, iar pentru farmacologie este de maxim interes înţelegerea modului de interacţiune a diferitelor medicamente ce au efecte asupra sistemului nervos. De asemenea în tehnica medicală se urmăreşte folosirea cunoştinţelor asupra funcţionării sistemului nervos pentru construirea de aparatură de investigare şi eventual tratament şi protezare din ce în ce mai perfecţionată, iar însăşi tehnica sistemelor de prelucrare a informaţiei poate beneficia de „mimarea" artificială a unor procese de tipul celor din sistemul nervos. În aceste condiţii, obiectivul pe care ni-l propunem în acest capitol este acela de a ilustra multiplele aplicaţii şi perspective prin cîteva exemplificări concludente. În mod deliberat

deci, terminăm prezentarea unui domeniu științific aflat în plină dezvoltare nu prin formularea unor concluzii cu rol de încheiere, ci prin ridicarea de noi probleme.

VII.1. CARACTERISTICI SPECIALE ALE DINAMICII CELULARE A NEURONILOR

Pe tot parcursul acestei lucrări ne-am referit în special la diferitele probleme biofizice ale excitației, insistînd în mod firesc asupra manifestărilor de natură electrică — suportul principal al transmiterii informației în sistemul nervos. Pentru a putea aborda însă unele probleme ale activității integrate, de nivel supracelular, ale sistemului nervos, este necesară sublinierea unor relații specifice existente între metabolismul celular și activitatea neuronilor.

În capitolul IV, a fost menționat faptul că metabolismul energetic al centrilor nervoși (care conțin corpii neuronali) este intens și că crește în urma stimulării. După unele estimări (date citate de Hydén, 1960), la om creierul utilizează $\approx 20\%$ din consumul de oxigen al organismului, metabolismul său energetic bazîndu-se predominant pe oxidarea glucozei și în mică parte pe glicoliză. Intensitatea metabolismului oxidativ al creierului explică rapida sa degradare ireversibilă în condiții de anoxie. Neuronii utilizează energia metabolică atît pentru propagarea semnalelor, cît și pentru multiplele necesități impuse de reînnoirea continuă (*turnover*) și dezvoltarea propriei lor structuri, ca și de sinteza substanțelor pe care ei le secretă.

Funcția de neurosecreție este o caracteristică foarte larg răspîndită a neuronilor căci, în afară de faptul că hipotalamusul și neurohipofiza au funcții de secreție hormonală bine precizate, majoritatea neuronilor secretă substanțele cu rol de mediator chimic prin care se realizează comunicațiile intercelulare. În afara aspectelor pur biochimice, această activitate intensă de sinteză impune și existența unor mecanisme speciale de transport al materialelor sintetizate în corpul neuronal, de-a lungul terminațiilor nervoase, a căror lungime poate fi de zeci de centimetri. Aportul continuu de materiale în nerv este implicat nu numai de eliberarea de mediator chimic, ci și de alte substanțe cu rol trofic pe care nervii le transferă celulelor cu care sînt în contact. În cazul nervilor motori, aceste substanțe trofice

determină distribuţia spaţială a moleculelor receptoare de pe membrana fibrelor musculare, viteza de contracţie şi în general metabolismul acestora (Guth, 1968), aşa cum dovedesc procesele degenerative ce se produc în urma denervării (Lindley şi colab., 1973). În cazul nervilor senzitivi, substanţele trofice eliberate de terminaţiile axonale controlează integritatea structurală şi funcţională a celulelor senzitive (Guth, 1969).

Un alt aspect specific al relaţiilor dintre metabolism şi funcţia de excitabilitate este antrenarea de către procesele metabolice ciclice din zona neuronală a unei activităţi electrice ritmice, adică generarea automată de impulsuri, fără stimulare externă. Înainte însă de a ne opri asupra acestor probleme, trebuie menţionată şi particularitatea neuronilor de a se găsi în asociere strînsă cu un alt tip de celule — nevrogliile sau celulele gliale.

VII.1.1. Interacţii ale neuronilor cu celulele gliale

Axonii fibrelor nervoase periferice sînt înconjuraţi de celule Schwann, din a căror înfăşurare se formează şi teaca de mielină (fig. III.9). În mod similar, neuronii din sistemul nervos central sînt asociaţi cu celule accesorii numite nevroglii, mult mai numeroase decît ei înşişi şi al căror volum total este aproximativ egal cu cel al neuronilor. În creierul vertebratelor sînt două tipuri de celule gliale : 1) oligodendrocitele, aflate în substanţa albă, unde din ele se formează mielina şi 2) astrocitele, ale căror terminaţii înconjură vasele capilare şi care sînt în contact şi cu neuronii (fig. VII.1.).

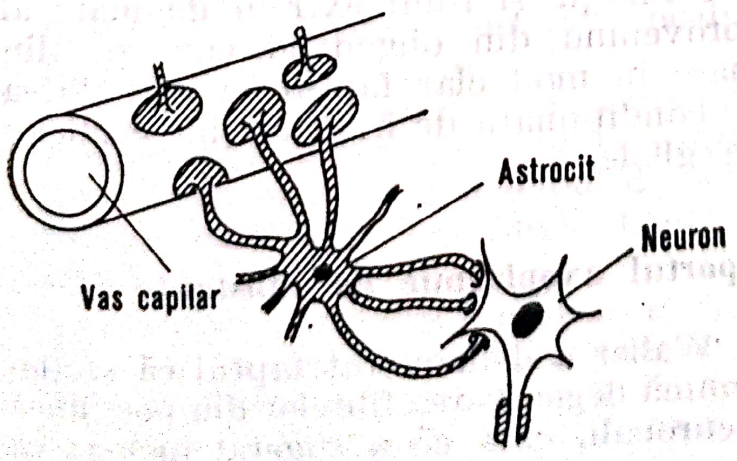


Fig. VII.1 : Schemă a relaţiilor dintre neuroni, astrocite şi vasele capilare.

Deoarece neuronii înşişi nu au nici o legătură directă cu capilarele, ci numai prin intermediul nevrogliilor, s-a emis ipoteza că schimburile de substanţe nutritive, produşi de dezasimilaţie şi chiar ioni, ale neuronilor s-ar face prin intermediul nevrogliilor. Arătînd însă că ionii şi moleculele mici difuzează uşor prin spaţiile intercelulare, cu toate că lărgimea acestor spaţii este numai în jur de 200 Å, Kuffler şi Nichols (1966) au ajuns la concluzia că nu este necesar să li se atribuie nevrogliilor rolul esenţial în schimburile de molecule mici ale neuronilor. Există însă cel puţin două roluri ale nevrogliilor care au fost dovedite în mod cert (Watson, 1974).

În cursul dezvoltării fetale a creierului la mamifere, astrocitele, care se diferenţiază înaintea neuronilor, îi ghidează pe aceştia, în sensul formării reţelei de interconexiuni sinaptice în neocortex (Rakic, 1971). Prin acest rol de orientare a formării interconexiunilor se poate explica şi hipertrofierea astrocitelor în cursul refacerii sinapselor degenerate după secţionarea axonilor (Watson, 1972).

Din punctul de vedere al activităţii neuronale, principalul rol al celulelor gliale este de a menţine concentraţia extracelulară a potasiului într-un domeniu restrîns de valori (Trachtenberg şi Pollen, 1970). Pe de o parte, ele împiedică difuzia liberă a potasiului care a ieşit din axoni şi din corpii neuronali în urma potenţialelor de acţiune, iar pe de altă parte, au rol de tampon, preluînd surplusul de potasiu, pe care îl redistribuie prin propriile lor membrane. În afară de funcţia de reglare a compoziţiei ionice a mediului extracelular al neuronilor, este probabil ca astrocitele să împiedice şi difuzia liberă a mediatorilor chimici eliberaţi de terminaţiile axonale, făcînd ca aceştia să acţioneze foarte localizat.

Adăugînd la aceste funcţii şi rolul extrem de mare al tecilor de mielină, provenind din oligodendrocite şi din celulele Schwann, apare în mod clar faptul că activitatea sistemului nervos este condiţionată de interrelaţiile celulelor neuronale cu celulele gliale.

VII.1.2. Transportul axoplasmic de substanţe

Încă din 1850. A. Waller a demonstrat faptul că secţionarea unui nerv determină degenerarea fibrelor din porţiunea separată de corpii neuronali, ceea ce a sugerat ipoteza că

axonul primeşte în mod continuu din zona neuronală materiale indispensabile pentru a-şi menţine viabilitatea. Existenţa unui transport lent de substanţe cu viteza de 1—10 mm/zi a fost dovedită în mod clar de mai mult timp (Weiss, 1969). Însă degenerarea walleriană apare pe distanţe lungi încă din primele zile după secţionarea nervului, aşa încît este de presupus existenţa şi a unui sistem mai rapid de transport.

În ultimii zece ani a fost într-adevăr pus în evidenţă un astfel de transport rapid (Lasek, 1970; Dahlström, 1971), studiat în modul cel mai complet de Ochs (1971, 1972) în nervul sciatic de pisică. Principiul experienţelor constă în a urmări apariţia unui maxim de radioactivitate în diferite puncte de pe nervul sciatic, după ce s-a injectat un aminoacid marcat (de regulă, leucină tritiată) în corpii celulari din ganglionul dorsal sau în motoneuronii din segmentul măduvei spinării de care aparţin fibrele nervului sciatic. În nervul sciatic de diferite mamifere a fost evidenţiat un transport rapid de proteine, cu viteze în jur de 40 mm/zi, atît în axonii motori, cît şi în cei senzitivi. Viteza de transport a proteinelor este independentă de diametrul fibrelor, dar depinde puternic de metabolismul energetic celular.

Transportul de substanţe prin axoni se face în mod diferit pentru fiecare din principalele grupe de substanţe. Astfel, lipoproteinele sînt transportate aproape exclusiv în mod lent, în timp ce polizaharidele şi proteinele sînt vehiculate şi cu viteza mare menţionată anterior. În ansamblu, sînt transportate rapid, alături de mediatorii sinaptici înşişi, substanţele necesare pentru menţinerea funcţiei sinaptice.

În figura VII.2, este prezentată o diagramă a etapelor prin care trece un aminoacid injectat în corpul neuronal pînă să fie transportat prin axoplasmă. Elementul esenţial îl constituie existenţa unui mecanism de control al intrării în fluxul axoplasmic, mecanism localizat probabil în aparatul Golgi din corpul neuronal.

Faptul că un aminoacid poate intra în fluxul axoplasmic imediat după sinteză sau numai după o prealabilă stocare în soma neuronală ca şi sistemul de control al intrării în axon explică existenţa celor două tipuri de transport, lent şi rapid.

Lucrînd cu diferiţi inhibitori metabolici, Ochs şi colaboratorii săi au constatat că substanţele care inhibă fosforilarea oxidativă blochează şi transportul axoplasmic rapid cu aceeaşi rapiditate şi eficienţă ca şi anoxia locală. Se impune deci

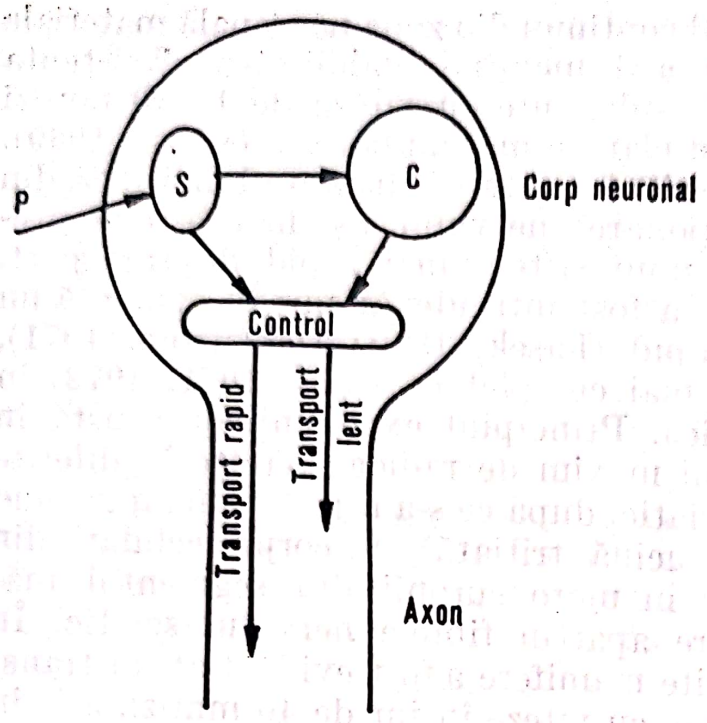


Fig. VII.2 (după Ochs şi colab., 1970): Schemă a etapelor prin care un precursor injectat în corpul neuronal, ajunge în fluxul axoplasmic. *P* — precursorul, *S* — sistemul de sinteză rapidă, *C* — compartimentul de stocare în corpul neuronal.

concluzia că pentru transportul axoplasmic rapid este necesară o aprovizionare continuă cu o cantitate de ATP, pe care glicoliza nu o poate furniza şi care îi este dată sistemului de transport în mod strict localizat, nu de la o distanţă mai mare. Faptul că şi potenţialele de acţiune şi transportul axoplasmic rapid încetează după un acelaşi interval de timp de la instalarea anoxiei ($\approx$ 10 min) sugerează furnizarea din aceeaşi sursă a ATP-ului necesar pentru ambele funcţii.

În ceea ce priveşte mecanismul concret al transportului axoplasmic, există mai multe ipoteze cu un caracter încă destul de speculativ, dar care implică toate asocierea transportului cu formaţiunile filiforme existente în axoni, neurofilamentele şi neurotubulii. De-a lungul acestora s-ar putea face transportul de substanţe printr-o continuă formare şi desfacere de legături dintre filamente şi substanţele transportate care eventual ar fi strînse sub formă de vezicule (Lumsden, 1968; Schmitt, 1968; Ochs, 1972).

VII.1.3. Autoexcitabilitatea neuronilor

Analizînd în repetate locuri, pe parcursul acestei lucrări, funcţia de excitabilitate a diferitelor celule, am vorbit despre proprietatea acestora de a răspunde prin potenţiale de acţiune, la stimuli externi de diferite naturi, atunci cînd

aceşti stimuli produc depolarizarea membranei peste o valoare prag.

Mulţi motoneuroni au însă capacitatea de a genera în mod periodic impulsuri, fără o stimulare externă evidentă. Această activitate automată spontană este proprie, de exemplu, neuronilor din centrul respirator (din bulbul rahidian) fiind foarte frecventă şi pentru neuronii din sistemul nervos ganglionar al nevertebratelor.

Generarea automată de impulsuri este extrem de evidentă în cazul muşchiului cardiac în care există zone (nodurile) capabile de depolarizare spontană ritmică cu viteză maximă în raport cu zonele învecinate. Aceste zone care stabilesc ritmul sînt numite „*pacemaker*" — termenul fiind întrebuinţat şi pentru neuroni şi alte celule autoexcitabile. Dudel şi Trautwein (1968) au explicat autoexcitabilitatea fibrelor Purkinje din cord, arătînd că membrana are chiar în stare de repaus o permeabilitate crescută faţă de sodiu. După un potenţial de acţiune, potenţialul membranei nu rămîne constant, ci se produce o depolarizare lentă datorită creşterii permeabilităţii pentru sodiu şi scăderii permeabilităţii pentru potasiu. Cînd depolarizarea atinge valoarea de prag, se generează un potenţial de acţiune, procesul continuînd ritmic în acest fel.

Acelaşi mecanism de bază poate explica şi autoexcitabilitatea neuronilor *pacemaker* ai nevertebratelor, numai că trebuie să se ia în considerare şi o dependenţă specifică a conductanţelor ionice membranare (în particular a conductanţei pentru potasiu) de metabolismul celular (Carpenter, 1973). În acest mod, pe calea controlului direct de către metabolismul celular al proprietăţilor membranei, se pot explica variaţiile de ritm şi existenţa mai multor ritmuri suprapuse, în cazul aceloraşi celule *pacemaker* (Vadász şi Salánki, 1976). Studiul bioritmurilor (Bünning, 1973), în particular a ritmurilor din activitatea nervoasă (Jouvet, 1972; Kayser şi Hildwein, 1977), domenii de un excepţional interes în sine, a depăşit etapa pur descriptivă, intrîndu-se în probleme de mecanism, numai prin raportare la ciclurile de reacţii biochimice oscilatorii. Este de aşteptat ca pe această linie să se ajungă şi la o înţelegere aprofundată a autoexcitabilităţii ritmice şi apoi la corelarea ei cu ritmurile circadiene şi lunare. Există deja unele modele de explicare a bioritmurilor la nivel membranar (Njus şi colab., 1974), dar acest domeniu în ansamblu este într-o etapă de început.

Scanned with OKEN Scanner

VII.2. MECANISME ALE ACTIVITĂŢII NERVOASE SUPERIOARE

În introducerea la acest capitol, am menţionat faptul că printre obiectivele de interes major ale studiului neurobiofizicii este şi înţelegerea mecanismelor fundamentale ale activităţii nervoase superioare. Desigur că un studiu sistematic al acestei activităţi depăşeşte cu mult cadrul lucrării de faţă, ceea ce ne propunem acum fiind numai de a ilustra în mod schematic modul în care din procesele de nivel celular se „clădesc" unele funcţii specifice creierului*.

Spre sfîrşitul secolului trecut, fiziologia sistemului nervos central a fost dominată de problema *localizărilor cerebrale.* Pe baza unor studii experimentale de extirpări şi provocări de leziuni sau de excitaţii, ca şi pe baza datelor anatomopatologice corelate cu manifestările clinice în bolile neuropsihice au fost descoperite în creier zone specializate pentru realizarea diferitelor funcţii psihofiziologice. De la începutul secolului nostru, constatîndu-se că psihismul ca atare nu este localizabil, neurofiziologii se interesează numai de modul în care funcţionează creierul ca organ al integrării superioare şi al comportamentului complex. Cele mai importante succese în această direcţie au fost obţinute prin metoda reflexelor condiţionate, elaborată de I. P. Pavlov, prin care legile reflexelor de la nivelul centrilor nervoşi inferiori au fost extinse şi pentru funcţionarea creierului. În ultimele decenii, microelectrofiziologia cerebrală a adus cele mai importante elucidări pe linia corelării comportamentului animalelor cu stimularea şi înregistrarea activităţii electrice din diferite zone ale creierului. În acelaşi timp, dezvoltarea neurochirurgiei a contribuit considerabil la înţelegerea fiziologiei creierului uman. Pentru o prezentare clară şi elementară a acestor probleme, recomandăm lucrarea introductivă a lui Chauchard (1974).

Există în prezent o cartografiere detaliată a zonelor scoarţei cerebrale la om, dar este foarte important de subliniat faptul că localizarea nu se referă decît la structurile complexe a căror funcţionare de ansamblu este necesară pentru realizarea diferitelor funcţii şi comportamente şi nu la acestea însele. Mai mult chiar, nu sînt riguros localizaţi

---

* Dintr-o literatură foarte vastă, menţionăm : Eccles, 1966 şi 1970.

decît neuronii psihomotori, implicați în mecanismele corticale de informare senzorială și de comandă a activităților. În ceea ce privește însă activitățile de coordonare gnozică și praxică, localizările neuronale nu sînt foarte stricte, aceste funcții superioare rezultînd din funcționarea de ansamblu a unor rețele neuronale complexe în care fiecare neuron nu are vreo funcție psihică proprie, ci contribuie la realizarea mai multora prin asocieri multiple și variabile cu alți neuroni. Spre deosebire de concepțiile mai vechi, în prezent se știe că lanțuri neuronale simple nu sînt implicate decît în realizarea reflexelor simple și în funcționarea căilor nervoase senzitive și motorii. Specifică și predominantă pentru realizarea activității nervoase superioare este existența în cortex a unor *rețele* neuronale constînd din căi multiple și paralele de circulație a excitației, astfel încît suprimarea unei părți din rețea nu abolește funcția de ansamblu.

În cadrul acestei discuții generale, trebuie subliniat și faptul că fiecare neuron dintr-o rețea, fiind supus multiplelor influențe excitatoare și inhibitoare ale celorlalți neuroni cu care este interconectat, realizează o sinteză a tuturor acestor influențe (§ III.1.2 și V.5.), starea sa variind nu între repaus și activitate, ci între diferite grade de activare (excitare) și inhibiție. Ideea generală ce se desprinde este deci a multitudinii de stări, dinamismului funcțional și antrenării complexe a activităților neuronale pentru ca din sinteza acestora să rezulte funcțiile psihice. Pornind de la principiile generale schițate mai sus ne vom opri asupra mecanismelor de realizare a proceselor de învățare și ale memoriei, acestea fiind activități nervoase a căror amploare la *Homo* contribuie în mod esențial în a-l face *sapiens*.

VII.2.1. Procesele de învățare și memoria

Atît termenul de „învățare" cît și cel de „memorie" au fost folosite în sensuri atît de diferite, încît este necesar ca în fiecare situație să fie definiți. Prin învățare vom înțelege tendința dobîndită prin antrenament de către un organism să răspundă cu probabilitate mai mare într-un mod anumit în situații în care sînt posibile mai multe comportări. În general, prin memorie, se înțeleg procesele de stocare și apoi de regăsire sau „citire" a unei informații. În cazul memoriei psihice, manifestată prin efectuarea unei

comportări noi la un timp după antrenament, cele două componente sînt învățarea, în sensul stocării de informație și reamintirea, adică regăsirea informației stocate. Aceste definiții nu sînt specifice pentru procesele umane de învățare și de memorizare, ci includ cazul mult mai general al oricărui animal căci, spre deosebire de concepția antropocentrică obișnuită, fenomene de învățare au fost descoperite la orice nivel evolutiv al regnului animal. La om, însă, procesele de învățare și memoria au o dezvoltare calitativ diferită chiar în raport cu cele mai apropiate primate, datorită existenței celui de-al doilea sistem de semnalizare. Este posibil chiar ca unul dintre factorii generatori ai imaginii de „suflet", drept ceva mai durabil decît corpul, să fie și insensibilitatea memoriei la tratamente care afectează puternic funcțiile organismului, știut fiind că, odată stabilită, memoria este practic imposibil de abolit.

În legătură cu stocarea de informații în sistemul nervos central, încă de la începutul secolului a apărut termenul *engram* (traductibil în mod aproximativ prin „urmă" sau „amprentă") referitor la modificările fizico-chimice din creier care reflectă dobîndirea și persistența unui anumit comportament. Referitor la natura detaliată a acestor modificări, pînă în prezent există doar ipoteze, unele dintre ele cu un caracter evident speculativ, ca de exemplu implicarea holografiei (Chopping, 1968). Deoarece însă baza fizică a operațiilor informaționale din sistemul nervos constă în capacitatea neuronilor de a genera, transmite și integra impulsuri în cadrul unor rețele complexe, iar toate transferurile interneuronale de informație sînt mediate de sinapse, este un consens foarte larg în a corela memoria cu reorganizări specifice ale asocierilor neuronale, deci ale sinapselor.

Se impun însă două precizări:

Mai întîi, referitor la localizarea memoriei, deși există dovezi că hipocampul are un rol deosebit, iar pe scoarța cerebrală au fost identificate mai multe arii specializate pentru memorie de diferite tipuri (optică, auditivă, gustativă), studiile lui K. S. Lashley privind efectele leziunilor corticale asupra memoriei au arătat că orice achiziție de memorie are reprezentări multiple pe cortex și că fiecare neuron cortical și poate chiar fiecare sinapsă nu aparțin numai la o engramă, ci la mai multe. O altă precizare necesară se referă la distincția ce trebuie făcută între două faze diferite: memoria de termen scurt (MTS) — timpi de ordinul

minutelor — și memoria de durată, consolidată sau de termen lung (MTL).

MTS pare a consta dintr-un tip specific de activitate electrică indusă în creier în timpul învățării, de exemplu circulația facilitată a impulsurilor în rețele neuronale reverberante. Argumentul esențial pentru natura electrică a MTS este că tratamentele care interferează cu activitatea electrică : inducerea prin electroșocuri sau pe cale chimică a unor convulsii generalizate, anestezia, hipoxia și hipotermia, sînt capabile să o abolească. Toate aceste tratamente nu mai au însă efect după consolidarea memoriei.

Spre deosebire de mecanismul electric al MTS, referitor la MTL, o serie de cercetări implică apariția de modificări chimice. Astfel, dacă sinteza de ARN este blocată, nu se mai produce consolidarea memoriei, deși animalele sînt perfect capabile să învețe problema respectivă. Rezultate similare se obțin și inhibînd sinteza proteică, dar ambele genuri de tratamente sînt active numai în intervalul de timp în care dă efecte și tratamentul convulsiv. Rezultă că stabilirea MTL implică o sinteză proteică, în mod evident, precedată de sinteza ARN, acestea producîndu-se în perioada de consolidare. Apoi, în favoarea ideii că moleculele proteice sau sintetizate stochează în structura lor informația dobîndită prin învățare pledează rezultatele lui H. Hydén și colaboratorii săi (Hydén și Lange, 1971) referitor la modificarea compoziției în baze azotate a ARN din creierul animalelor care au învățat un anumit comportament. Astfel, învățarea nu numai că mărește conținutul de ARN din neuroni, dar crește semnificativ raportul adenină/uracil. Animalele de control supuse la stimulare senzorială amorfă, fără învățare, prezintă o creștere a cantității de ARN, dar fără modificarea compoziției (Rappaport și Daginawala, 1968).

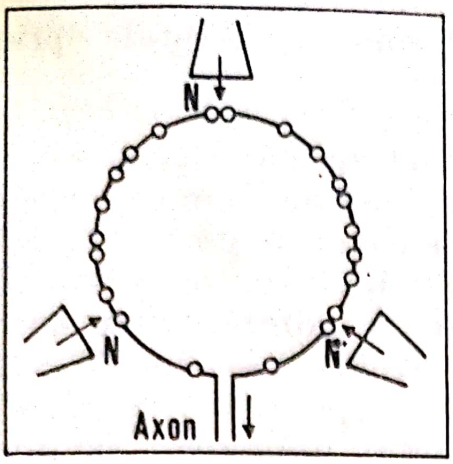
Aceste observații pot fi corelate, dar nu în mod univoc, cu ideea că activarea repetată duce la un anumit gen de creștere sinaptică ce implică participarea căilor metabolice de sinteză proteică. Încă din 1911 Ramon y Cajal a asociat învățarea și memoria cu activarea și creșterea sinaptică, iar uitarea cu regresia eficacității sinaptice în urma utilizării reduse. În 1951 J. Z. Young a avansat ideea că o sinapsă matură este rezultatul global al unor procese continue de creștere și degenerare a terminațiilor neuronale și a sugerat că la baza plasticității sistemului nervos stă modificarea acestor procese de către activitatea neuronală. Pro-

blema este de a se explica mecanismul prin care această activitate poate să orienteze formarea rețelelor neuronale.

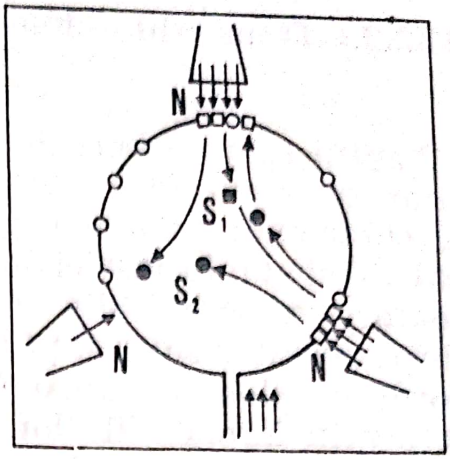
Unii autori (Wiesel și Hubel, 1974) consideră că toată rețeaua neuronală este specificată genetic anterior experienței proprii a respectivului organism, interacția acestuia cu mediul (deci și învățarea) avînd doar rol să declanșeze programe prestabilite și să stabilizeze organizarea sinaptică prin verificare funcțională, iar disfuncția în perioade critice antrenînd regresia unor conexiuni sinaptice deja specificate. Acest punct de vedere poate fi considerat drept „preformist" în opoziție cu punctul de vedere „empiricist" conținut în ideea creșterii sinaptice (Pettigrew, 1974) sau în ideea că activitatea trasează căi specifice de circulație a impulsurilor într-o rețea neuronală care inițial este relativ dezordonată (Von der Malsburg, 1973).

O ipoteză recentă care se situează între aceste două puncte de vedere este aceea că mecanismul de determinare a rețelelor neuronale se bazează pe stabilizarea selectivă a sinapselor în cursul dezvoltării (Changeux și colab., 1973, Changeux și Danchin, 1976). Pornind de la constatarea că ADN-ul existent în nucleul unui ovul fecundat poate codifica structura a cel mult cîteva milioane de proteine, deci că formidabila complexitate de interconectare a neuronilor din sistemul nervos central nu poate fi integral codificată genetic prin proteine de pe suprafața celulelor care să facă posibilă recunoașterea prin complementaritate între neuroni, Changeux presupune că este o determinare genetică numai a conexiunilor dintre clase de celule, forma finală de conectare depinzînd de stabilizarea selectivă a anumitor sinapse în cursul activității neuronale. O altă presupunere de bază a modelului este aceea că orice sinapsă, atît excitatoare cît și inhibitoare, se poate afla în cel puțin trei stări: L(abilă), S(tabilă) și D(egenerată). Prin creștere apar stări labile care fie se stabilizează, fie regresează ireversibil, aceste tranziții L → S și L → D fiind reglate de activitatea celulei postsinaptice. În fig. VII.3. este ilustrat posibilul mecanism al acestor tranziții.

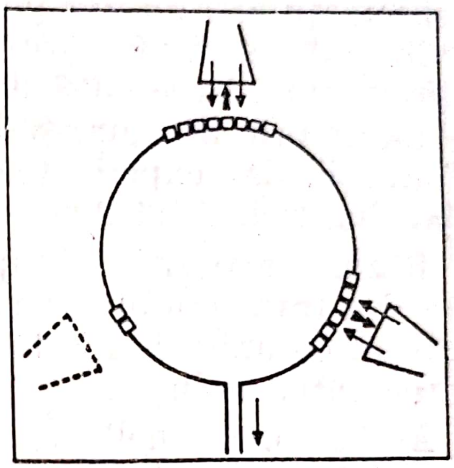
Terminația presinaptică activă eliberează un factor anterograd (care ar putea fi chiar mediatorul chimic sinaptic) prin a cărui legare de un receptor de pe membrana postsinaptică se declanșează în această celulă un semnal de oprire a sintezei de receptori, cantitatea acestor molecule de pe



a



b



c

Fig. VII.3 (după Changeux și Danchin, 1976): Localizarea selectivă a receptorilor sinaptici și stabilizarea selectivă a sinapselor. o reprezintă receptorul în stare labilă și mobilă pe suprafața membranei; □ — receptorul în stare imobilizată; S_1, S_2 sînt factorii de cuplaj intern; N este factorul anterograd, de exemplu mediatorul chimic, eliberat de terminațiile presinaptice în activitate, iar → reprezintă factorul chimic retrograd eliberat de zonele presinaptice care au receptorii stabilizați.

membrană rămînînd deci limitată. Pe membrană receptorii există, fie sub formă labilă, capabili să difuzeze pe suprafață și să fie degradați rapid în zonele extrasinaptice, fie sub formă stabilă, imobilizați în zona sinaptică unde sînt degradați mult mai lent. Trecerea în această formă s-ar face sub influența combinată a factorului anterograd și a unor factori de cuplaj intern, eliberați în zonele postsinaptice active. Odată stabilizate în acest fel, zonele postsinaptice eliberează un factor retrograd ce stabilizează la rîndul său terminațiile presinaptice corespunzătoare, celelalte degenerînd.

Meritul acestei ipoteze este de a propune o schemă detaliată și plauzibilă a proceselor prin care propagarea de impulsuri între celule poate determina o engramă, care în acest caz este stabilizarea selectivă a anumitor conexiuni sinaptice. Desigur că pentru acceptarea ei trebuie să fie identificați toți factorii presupuși că intervin, obiectiv care este foarte stimulator pentru cercetările de neurobiologie moleculară.

VII.2.2. Transferul chimic al informaţiei obţinute prin învăţare

Faptul că procesele de învăţare determină, aşa cum s-a arătat în paragraful precedent, modificări biochimice stabile în creierul animalelor a sugerat ideea că ar fi posibil transferul direct al informaţiei dobîndite prin învăţare de un animal donator, extrăgînd din creierul său şi administrînd unui animal primitor substanţa în a cărui structură este codificată informaţia dobîndită. Acest gen de experienţe, impresionante prin implicaţiile lor, au alimentat numeroase ficţiuni şi speculaţii, dar au fost primite cu rezerve datorită aparentei lor lipse de fundamentare. Nici în prezent nu există o explicaţie unanim acceptată a suportului chimic al informaţiei dobîndite prin învăţare şi deci a transferului direct al acestei informaţii, dar experienţele în acest sens sînt semnificative (Fjerdingstad, 1971).

Rezultate pozitive asupra unui comportament de învăţare şi a transferului său chimic au fost comunicate chiar în legătură cu animale foarte puţin evoluate : planarii, anelide, platelminte, moluşte.

Astfel, McConnell (1962) a constatat că planariile pot „învăţa" să se orienteze în raport cu stimuli fizico-chimici de condiţionare, învăţarea menţinîndu-se în ambele jumătăţi ale unei planarii secţionate care se regenerează, dar fiind abolită dacă în timpul regenerării se administrează ribonuclează. Planarii hrănite cu altele care au învăţat un anumit obiectiv îl învaţă mai uşor decît cele hrănite cu planarii obişnuite.

Experienţe mai complexe de transfer chimic al comportamentului învăţat au fost făcute de G. Ungar şi grupul său, atît pe peşti (Ungar şi colab., 1972), cît şi pe şoarece. Astfel, şoareci donatori sînt plasaţi în coada unei incinte bifurcate în formă de „Y" şi li se aplică electroşocuri. Sînt antrenaţi să se refugieze, fie pe baza unei discriminări spaţiale dreapta-stînga, fie a unei discriminări de lumină. În experienţe mai complexe de discriminare audio-vizuală, un grup de animale a fost antrenat să fugă spre stînga la un semnal luminos şi spre dreapta la unul sonor, iar un alt grup a fost antrenat invers. În toate cazurile, animalele primitoare fără nici un antrenament prezintă în mod semnificativ statistic tendinţa de a răspunde la fel ca donatorii.

Încercările de transfer de la donatorii antrenaţi la primitori s-au făcut mai întîi cu omogenate integrale de creier, iar apoi omogenatele active au fost centrifugate (la 25 000—65 000 g), activitatea rămînînd în supernatant. Prin dializa supernatantului, au fost separate moleculele mici de cele cu masa peste 10 000 u. Factorii chimici care transferă capacitatea de discriminare întuneric-lumină nu dializează, în timp ce pentru discriminarea stînga-dreapta, activitatea este prezentă în dializate. După dializă s-a făcut concentrarea prin liofilizare şi apoi purificarea prin precipitare cu acetonă. Toţi factorii activi de transfer au fost precipitabili. Precipitatul redizolvat a fost fracţionat prin filtrare pe gel şi cromatografie în strat subţire. Materialul cel mai purificat, extras de la animale învăţate să evite întunericul, eficient în doze de 0,1 μg/şoarece, este o pentadecapeptidă.

Interpretarea pe care o dă Ungar (1970; 1971) posibilităţii de transfer chimic a unui comportament învăţat este în esenţă următoarea: încă înainte de a avea loc procese de învăţare, sistemul nervos este capabil să răspundă la diferiţi stimuli în mod prestabilit, datorită existenţei unor reţele neuronale înnăscute, formate în cursul dezvoltării embrionare printr-un mecanism de recunoaştere intercelulară al neuronilor (realizat prin existenţa pe suprafaţa acestora a unor molecule *marker* avînd structura codificată în genom). După Ungar, învăţarea constă la nivel elementar din crearea de noi conexiuni între căile existente (spre deosebire de ipoteza menţionată anterior a lui Changeux), astfel încît un stimul să poată evoca un răspuns nou, neprogramat. Atunci cînd neuronii imediat învecinaţi conduc impulsuri simultan sau succesiv într-o secvenţă bine definită, modificările de permeabilitate apărute în punctele de contact permit deschiderea de noi sinapse. Aceste sinapse nou create într-un anumit proces de învăţare sînt specificate chimic printr-un complex molecular format din markerii căilor implicate. Formîndu-se la mii de sinapse similare, un astfel de complex poate fi extras în cantităţi semnificative, din creierul unui animal antrenat, iar prin administrare la primitori el reconstituie în creierul acestora respectiva sinapsă pe care o codifică.

Caracterul în mare parte speculativ şi destul de vag al acestei explicaţii este evident; am menţionat-o totuşi pentru sugestiile interesante pe care le conţine şi, mai ales, pentru că este o tentativă de a corela realizarea proceselor de

învăţare şi a memoriei stabile cu dinamica celulară a neuronilor încadraţi în reţele. Desigur că trebuie să încheiem prezentarea şi a acestei probleme, constatînd că elucidarea mecanismelor concrete ale activităţii nervoase superioare este într-o fază abia incipientă.

VII.3. MECANISME DE ACŢIUNE A MEDICAMENTELOR ASUPRA SISTEMULUI NERVOS

O mare varietate de substanţe au acţiune neurotropă fiind utilizate fie ca medicamente în tratamentul bolilor neuropsihice, fie ca anestezice şi calmante, atunci cînd este nevoie să fie blocată (local sau general) în mod temporar funcţia de excitabilitate. Modalităţile în care acţionează aceste tipuri de substanţe nu pot fi înţelese decît prin raportare la mecanismele fundamentale ale funcţionării sistemului nervos însuşi, studiul lor constituind astfel o aplicaţie a neurobiofizicii. Numai pe această cale se va putea ajunge la o terapie raţională şi specifică a fiecărei afecţiuni neuropsihice şi vor putea fi stabilite criterii ferme care să orienteze sinteza de noi medicamente.

Abordînd mecanismele de acţiune a medicamentelor asupra sistemului nervos, trebuie să subliniem de la început faptul că prin aceasta urmărim mai ales să relevăm o problematică de excepţională importanţă practică în care pînă în prezent domină empirismul, iar succesele obţinute provin în special din tatonări. Deoarece, însă, în cazul anestezicelor şi calmantelor există suficiente elemente care să permită o abordare biofizică, ne vom opri asupra acestui caz în special.

Fenotiazinele (în particular clorpromazina şi substanţele înrudite) s-au dovedit foarte utile în tratarea psihozelor funcţionale (schizofrenia, maniile agresive). Deşi aceste substanţe au efecte inhibitoare asupra metabolismului oxidativ şi glicolitic al neuronilor şi în particular asupra formării de compuşi fosfatici macroergici, este improbabil ca acestea să stea la baza acţiunii lor antipsihotice, deoarece efectele menţionate se produc la concentraţii mult peste dozele active clinic şi sînt foarte variabile între diferitele fenotiazine (Gabay, 1971). De aceea, s-a propus ipoteza că principalul mecanism de acţiune al fenotiazinelor ar consta din producerea de modificări ale permeabilităţii membranelor, căci scăderi ale permeabilităţii membranelor eritrocitare pentru apă şi ioni au fost obţinute la concentraţiile de clor-

promazină din domeniul dozelor farmacologice. Explicația nu este satisfăcătoare, deoarece aceste efecte sînt foarte nespecifice, fiind produse de exemplu și de către anestezicele locale și de substanțele antihistaminice (Seeman și Weinstein, 1966).

La fel de puțin se cunoaște și despre mecanismul de acțiune al litiului, ale cărui efecte terapeutice și chiar profilactice contra psihozelor maniaco-depresive au fost demonstrate în mod clar (Schou, 1971). În concentrațiile utilizate clinic, litiul inhibă respirația mitocondriilor extrase din creier, inhibă intrarea potasiului în celulele corticale și afectează metabolismul aminoacizilor, fără a fi însă evidentă legătura dintre aceste efecte și acțiunea sa specifică de medicament.

În ceea ce privește substanțele antidepresive, există dovezi clinice care sugerează că își exercită efectul prin modificările induse în metabolismul aminelor biogene (în special norepinefrinei), cu rol de mediatori chimici în creier. Atît inhibitorii monoaminoxidazei, cît și substanțele stimulante, ca amfetamina și cocaina, ca dealtfel și șocurile electroconvulsive, toate produc o creștere a cantității de norepinefrină prezentă la receptorii specializați de pe membranele neuronilor, stimulînd deci, prin această facilitare a transmisiei sinaptice, activitatea neuronală (Schildkraut și Gershon, 1971).

În afară de medicamentele neurotrope, se studiază intens și efectul substanțelor halucinogene căci, în afară de faptul că utilizarea lor de către toxicomani este un grav flagel într-o serie întreagă de țări, interesul din punct de vedere științific față de această problemă decurge din posibilitățile de a se clarifica mecanismele proprii ale creierului prin care se realizează procesele perceptuale, emoționale și de gîndire pe care aceste substanțe le afectează. Nici în acest caz nu se cunosc pînă în prezent efectele de interacție specifică cu dinamica neuronală, astfel încît, după această succintă referire la diferitele tipuri de substanțe cu acțiune asupra sistemului nervos central, putem insista asupra faptului că elucidarea efectelor lor rămîne ca un obiectiv important pentru neurobiofizica aplicată.

VII.3.1. Mecanismul de acțiune a substanțelor anestezice

În modul cel mai cuprinzător, anestezicele pot fi definite drept substanțe capabile ca prin aplicare directă să blocheze

în mod reversibil potențialul de acțiune al celulelor nervoase și musculare, fără să afecteze cu mai mult de 5 mV potențialul de repaus. Pe baza acestei definiții, pot fi considerate drept anestezice un număr mare de substanțe liposolubile, așa cum sînt narcoticele, anticonvulsivele, antiaritmicele, vasodilatatoarele și, de asemenea, substanțele antihistaminice, hormonii steroizi și detergenții (Seeman, 1972).

Deoarece anestezicelor nu le sînt caracteristice anumite grupări chimice și întrucît efectul lor este reversibil, reiese clar că între anestezic și sistemul biologic nu se produce o reacție chimică, ci au loc interacțiuni de natură fizică. De asemenea, deși anestezicele acționează vizibil asupra organitelor celulare și inhibă metabolismul celular, în prezent există dovezi ferme că acțiunea lor specifică se produce la nivelul membranelor excitabile. Astfel, aceste substanțe blochează și excitabilitatea axonilor giganți perfuzați, lipsiți de axoplasmă, iar concentrațiile la care produc modificări în fazele intracelulare sînt de aproximativ 10 ori mai mari decît acelea la care blochează conducerea nervoasă și transmisia sinaptică.

Constatarea că toate substanțele cu efect anestezic sînt liposolubile a fost sintetizată sub forma regulii clasice a lui Mayer și Overton, care afirmă că „anestezia se manifestă atunci cînd orice substanță, indiferent de natura sa, a atins o anumită concentrație critică în lipidele din celulă". Dat fiind faptul că membranele celulare constau dintr-o matrice lipidică, însăși liposolubilitatea anestezicelor este o indicație a localizării acțiunii lor la nivelul membranelor, sugerînd totodată că anestezicele au efecte, desigur în mod diferit, și asupra membranelor neexcitabile, lucru pe deplin dovedit (Seeman, 1972; Mullins, 1971).

În timp ce majoritatea corelațiilor dintre capacitatea anestezică și proprietățile fizice ale unei molecule se referă la dizolvarea ei într-o fază neapoasă, Miller (1961) și Pauling (1961) au presupus că esențială este posibilitatea ca respectiva moleculă să se înconjoare cu molecule de apă, perturbînd astfel structura apei la suprafața celulei. Această ipoteză nu oferă de fapt o explicație a modului în care se produce anestezia, căci nu se raportează la mecanisme dovedite ale excitației. De asemenea, alterări ample ale structurii apei din vecinătatea suprafeței celulare sînt de așteptat și de la o soluție concentrată (de exemplu, de NaCl sau de zaharoză), care însă nu au vreun efect anestezic. Orice teorie

a anesteziei trebuie să explice nu numai în ce condiții se produce anestezia (așa cum face, de exemplu, regula Mayer-Overton), ci și modul în care substanța anestezică blochează procesele din care constă potențialul de acțiune.

Numeroase cercetări (trecute în revistă de Seeman, 1972) au arătat că în condiții de anestezie generală, substanța anestezică, intrată în faza lipidică a membranei celulare, ocupă 0,02% din volumul acesteia, iar în condiții de anestezie locală, 0,3%. Intercalarea moleculelor de anestezic în membrană dezordonează și fluidizează componenții acesteia, determinînd o umflare a membranei cu 0,4% în cazul anesteziei generale și pînă la 3% în anestezia locală, adică o creștere de $\approx$ 10 ori mai mare decît volumul ocupat de anestezic.

Una dintre consecințele acestei expandări a membranei este probabil producerea de modificări conformaționale ale acelor zone din membrană prin care trec fluxurile ionice în timpul excitației, adică ale canalelor ionice. S-a observat de mult timp faptul că diferite anestezice reduc faza de creștere a potențialului de acțiune, fază care se asociază cu deschiderea canalelor pentru sodiu (§ III.3.2.) așa încît este în prezent clar că efectul anestezic decurge în primul rînd din reducerea conductanței pentru sodiu (g_{Na}) a membranei. Într-adevăr, blocarea excitabilității de către anestezice poate fi compensată parțial prin creșterea concentrației externe de sodiu. Anestezicele inhibă și conductanța pentru potasiu (g_K) a membranelor excitabile, dar la concentrații mai mari (de $\approx$ 10 ori) decît acelea la care este inhibată g_{Na}.

Studii recente efectuate în condiții de potențial fixat, trecute în revistă de Strichartz (1976) și Kaufman (1977), arată că moleculele de anestezic se leagă în interiorul canalelor pentru sodiu care s-au deschis în timpul depolarizării membranei, împiedicînd fluxul de sodiu. Legarea selectivă a anestezicelor de canalele deschise explică creșterea efectului blocant la frecvențe mai mari ale impulsurilor, atunci cînd sînt deschise mai multe canale.

Sensibilitatea mai mare la anestezie a fibrelor mici decurge probabil din diferențele de constantă de lungime, adică de distanța ce trebuie expusă la anestezic pentru abolirea conducerii. Astfel, blocarea cu precădere a căilor nervoase senzitive față de cele motoare se explică prin aceea că informația senzorială este transmisă ca salve de impulsuri cu frecvență ridicată și că fibrele senzitive au în general diametre mai mici decît cele motoare.

Un alt aspect important al acțiunii anestezicelor este și acela că efectul lor se manifestă mai puternic la nivelul sinapselor decît pe fibrele nervoase înseși, deci că cel puțin unul din procesele din care constă transmisia sinaptică (subcapitolul V.2.) este mai sensibil la efectul anestezicelor. Este foarte probabil ca acest proces să fie deschiderea de către mediatorul chimic a unor canale ionice specifice în membrana postsinaptică.

În sfîrșit, menționăm și faptul că, blocarea conducerii potențialului de acțiune se produce la o concentrație de anestezic mai mică decît aceea care inhibă excitația locală, așa încît, deși celulele antesteziate nu mai conduc impulsuri, ele vor răspunde prin potențiale locale (§ III.1.2.) la o stimulare intensă. Ținînd seama de corelarea anesteziei cu deschiderea canalelor pentru sodiu și de faptul că potențialele locale depind numai de caracteristicile pasive ale membranelor celulare, acest efect apare perfect explicabil.

* * *

Această analiză a mecanismului anesteziei oferă, credem un exemplu ilustrativ pentru modul în care o abordare de tip biofizic poate duce la înțelegerea aprofundată a mecanismelor de acțiune ale medicamentelor.

În afară de cele cîteva probleme concrete la care ne-am referit în acest capitol, cunoașterea neurobiofizicii este de maximă importanță, sau chiar indispensabilă, pentru o lungă serie de aplicații tehnico-medicale, a căror prezentare depășește cadrul și obiectivul acestei lucrări introductive. Astfel, dacă perfecționarea aparaturii de înregistrare a biopotențialelor generate de diferite etaje ale sistemului nervos este în principal o problemă tehnică, în schimb pentru extragerea din aceste biopotențiale a unor informații utile din punct de vedere clinic, esențial este progresul cunoștințelor de neurobiofizică.

De asemenea, conjugînd aceste cunoștințe cu posibilitățile oferite de dezvoltarea electronicii, se deschid perspective excepționale pentru realizarea de proteze senzoriale complexe, așa cum ar fi convertizori optico-tactili și chiar proteze vizuale bazate pe stimularea cortexului vizual la orbi, proteze cohleare implantabile sau neurostimulatori implantabili care să compenseze paraliziile (White și Meindl, 1977). În sfîrșit, neurobiofizica este indispensabilă și pentru domeniul de

mare viitor al ingineriei factorilor umani (Holt şi Stevenson, 1977), adică optimizarea interacţiilor omului cu maşinile tot mai complexe de care se foloseşte, în condiţiile în care aceste interacţii depind în măsură din ce în ce mai mare de capacitatea omului de a prelucra informaţii.

BIBLIOGRAFIE

BÜNNING, E. (1973), The Physiological Clock, Springer Verlag, New York.

CARPENTER, D. O. (1973), în *Neurobiology of Intervertebrates*, Akadémiai Kiadó, Budapest.

CHANGEUX, J. -P., COURRÈGE, PH., DANCHIN, A. (1973), „Proc. Nat. Acad. Sci. USA.", *70*, 2974.

CHANGEUX, J. -P., DANCHIN, A. (1976), „Nature", *264*, 705.

CHAUCHARD, P. (1974), *Le cerveau humain*, Presses Univ. de France, Paris.

CHOPPING, P. T. (1968) „Nature", *217*, 781.

DAHLSTRÖM, A. (1971), „Phil. Trans. Roy. Soc. London", *B. 261*, 325.

DUDEL, J., TRAUTWEIN, W. (1968), „Pflügers Arch. ges. Physiol.", *267*, 553.

ECCLES, J. C. (ed.) (1966), *Brain and Conscious Experience*, Springer Verlag, Berlin.

ECCLES, J. C. (1970), *Facing Reality*, Springer Verlag, New York.

FJERDINGSTAD, E. J. (ed.) (1971), *Chemical Transfer of Learned Information*, North Holland, Amsterdam.

GABAY, G. (1971), Ch. 12, în *Handbook of Neurochemistry*, vol. 6, A. Lajtha (ed.) Plenum Press, New York.

GUTH, L. (1968), „Physiol. Rev.", *48*, 645.

GUTH, L. (ed.) (1969), „Neurosci. Res. Program. Bull.", *7*, nr. 1.

HOLT, H. O., STEVENSON F. L. (1977), „Science", *195*, 1205.

HYDÉN, H. (1960), în *The Cell*, vol. IV, J. BRACHET şi A. E. MIRSKY (eds.) Academic Press, New York.

HYDÉN, H., LANGE, P. (1971) în *De la physique théorique à la biologie*, M. MAROIS (ed.) Ed. du CNRS, Paris.

JOUVET, M. (1972), „Ergebn. Physiol.", *64*, 166.

KAUFMAN, R. D. (1977), „Anesthesiology", *46*, 49.

KAYSER, CH., HILDWEIN, G. (1977), „Chronobiologia", *4*, 18.

KUFFLER, S. W., NICHOLS, J. G. (1966), „Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharmakol", *57*, 1.

LASEK, R. (1970), „Int. Rev. Neurobiol", *13*, 289.

LINDLEY, B. D. KIRBY, A. C., STUESSE, S. C., PICKEN, J. R. (1973), „Am. J. Physiol.", *225*, 171.

LUMSDEN, C. E. (1968), în *Structure and Function of Nervous Tissue* vol. I, G. H. BOURNE (ed.), Acad. Press., New York.

GLOSAR DE SIMBOLURI ŞI NOŢIUNI UZUALE

Caracterul pluridisciplinar al acestei monografii a impus folosirea de noţiuni din domenii variate, aparţinînd atît ştiinţelor fizico-chimice cît şi biologico-medicale. Majoritatea acestora sînt definite sau explicate fie în text, fie în note infrapaginale. În acest glosar includem numai acele cîteva noţiuni uzuale, a căror explicare în cuprinsul lucrării ar prejudicia nivelului acesteia, dar dintre care unele, deşi foarte familiare unor cititori, necesită uneori a fi reamintite.

Biologie

ADN — acid dezoxiribonucleic: bioheteropolimer aflat în special în nucleele celulare, prin a cărui secvenţă de monomeri este codificată şi stocată informaţia genetică.

ARN — acid ribonucleic: bioheteropolimer implicat în transcrierea informaţiei genetice din secvenţa de monomeri ai ADN în secvenţa de aminoacizi ai proteinelor.

ATP — acid adenozintrifosforic (sau adenozintrifosfat): substanţă ce serveşte drept mediator universal între procesele biochimice eliberatoare de energie (exergonice) şi cele în care este utilizată energia (endergonice) în toată lumea vie, deoarece la formarea legăturilor pirofosforice este stocată energie chimică ce se eliberează apoi prin *hidroliza* (vezi) acestor legături.

Axon, cilindrax sau fibră nervoasă: vezi *neuron*.

Axoplasmă: *citoplasma* (vezi) din interiorul axonilor.

Butoni sinaptici sau butoni terminali: terminaţii ale axonilor prin care aceştia fac contact sinaptic cu alte celule.

Citoplasmă: masa de materie vie din celulă, cu excepţia nucleului.

Dendrite: vezi *neuron*.

Ganglion nervos: ansamblu de neuroni care formează împreună un centru în care sosesc, sînt prelucrate şi de unde pleacă impulsuri nervoase.

Metabolism celular: însuşirea definitorie şi esenţială a celulelor vii de a transforma chimic substanţele, prin descompunerea moleculelor mari ce con-

stituie substraturile nutritive (catabolism) și resinteza de molecule mari specifice respectivei celule (anabolism). Odată cu transformările de substanțe au loc și procese de eliberare, utilizare și înmagazinare de energie.

Neuron sau celulă nervoasă : unitatea structurală și funcțională a sistemului nervos. Neuronii au dimensiuni și forme foarte diferite, dar în general constau din corpul sau soma neuronală (numit și pericarion, deoarece conține nucleul celular) și din prelungiri : dendritele (prin care impulsurile circulă în sens celulipet) și axonul (prin care impulsurile circulă celulifug).

Pericarion, corp sau soma neuronală : vezi *neuron*.

Fizică și chimie fizică

Activitate chimică a unui component într-o soluție : o mărime proporțională cu fracția molară sau cu concentrația acelui component în soluție, prin care sînt caracterizate în mod riguros proprietățile fizico-chimice ale soluției. Activitatea este produsul dintre concentrație și un coeficient de activitate care tinde spre unitate pentru soluții infinit de diluate.

Capacitate electrică a unui condensator : raportul dintre sarcina electrică acumulată pe fiecare din cele două armături ale unui condensator și diferența de potențial dintre acestea. Se măsoară în farad : 1 F = 1 C/1 V.

Conductanță : inversul rezistenței electrice (vezi) a unui conductor. Se măsoară în siemens, notat în mod uzual cu Ω^{-1}, deoarece reprezintă 1/1 Ω.

Cuantă : cantitatea elementară de energie din care este alcătuită orice radiație electromagnetică și, în particular, lumina. Valoarea unei cuante depinde numai de frecvența respectivei radiații. Particula de cîmp electromagnetic avînd energia de o cuantă se numește *foton*.

Curent electric : circulația de sarcină electrică (electroni sau ioni) în corpurile conducătoare de electricitate. Intensitatea curentului electric se măsoară în amperi, 1 amper reprezentînd circulația unei sarcini de 1 coulomb în 1 secundă : 1 A = 1 C/1 s.

Energie liberă : acea parte din energia internă a unui sistem care poate fi integral convertită în travaliu (mecanic, electric etc.). Se măsoară în unitatea de energie, joule (simbol J).

Entropie : parametru de stare care exprimă gradul de ordonare al unui sistem, precum și capacitatea acestuia de a efectua travaliu în urma unor transformări spontane de stare. Cu cît entropia este mai ridicată, cu atît sistemul este mai puțin ordonat și are o capacitate mai redusă de a efectua travaliu.

Fotoliză : descompunerea unei substanțe sub influența luminii.

Foton : vezi *cuantă*.

Forțe Van der Waals : forțele de coeziune intermoleculare, de natură electrostatică.

Gradient : variația unei anumite mărimi între două puncte sau regiuni din spațiu, raportată la distanța dintre acestea.

Hidroliză : disocierea moleculelor de acizi, baze și săruri în anioni și cationi, în urma dizolvării în apă, prin interacție cu moleculele dipolare ale acesteia.

Impedanță : raportul dintre tensiune și curent, într-un circuit constînd în afară de rezistențe și din condensatori și bobine și alimentat cu tensiuni alternative. Se măsoară ca și rezistența în ohmi : $1\Omega = 1$ V/1 A.

Izomerizare : schimbarea distribuției spațiale a atomilor unei molecule, antrenînd schimbarea proprietăților fizico-chimice ale acesteia.

Legătură de hidrogen sau punte de hidrogen : interacție electrostatică inter- sau intramoleculară ce se realizează în combinațiile ce conțin atomi de H legați de atomi puternic electronegativi : O, N. Energia legăturilor de H este mai mică decît a legăturilor chimice, dar mai mare decît a forțelor Van der Waals.

Numărul lui Avogadro : Numărul de molecule din 1 mol (sau 1 kmol) din orice substanță. Are valoarea : $N_A = 6{,}023 \times 10^{23}$ molecule/mol.

Potențial (electro)chimic molar : variația *energiei libere* (vezi) a unui sistem atunci cînd numărul de moli ai componentului considerat variază cu o unitate. În cazul componenților ionizați și al sistemelor cu încărcări electrice diferite, în locul potențialului chimic se utilizează potențialul electrochimic.

Potențial electric într-un punct : energia necesară pentru a transporta o unitate de sarcină electrică din acel punct, la infinit. Diferența de potențial este tensiunea electrică, ce se măsoară în volți (simbol V).

Protomer : unitate din alcătuirea agregatelor macromoleculare, de obicei proteice.

Q_{10} : raportul dintre vitezele unui proces (de exemplu, reacție chimică) la două temperaturi diferind prin 10°.

Rezistență electrică : mărime ce exprimă frecările interne dintre sarcinile electrice în mișcare și materialul prin care circulă, ducînd la degajarea de căldură. Se măsoară în ohmi (vezi *impedanță*).

Șunt : rezistență mai mică plasată în paralel între două puncte din circuit între care în mod normal este rezistență ridicată.

Simboluri utilizate pentru submultipli și multipli ai unităților de măsură :

p (pico) = 10^{-12} (de exemplu : 1 pmol = 10^{-12} mol) ;
n (nano) = 10^{-9} (de exemplu : 1 nm = 10^{-9} m) ;
μ (micro) = 10^{-6} (de exemplu : 1 μV = 10^{-6} V) ;
m (mili) = 10^{-3} (de exemplu : 1 ms = 10^{-3} s) ;
k (kilo) = 10^{3} (de exemplu : 1 kcal = 10^{3} cal) ;
M (mega) = 10^{6} (de exemplu : 1 MΩ = 10^{6} Ω).

Matematică (notații)

$\frac{dV}{dt}$: *derivata funcției V în raport cu variabila t* de care depinde. Exprimă raportul dintre variația valorilor lui *V* și cele ale lui *t*, atunci cînd acestea din urmă sînt infinit de apropiate.

$\frac{\partial V}{\partial t}$ și $\frac{\partial V}{\partial x}$: *derivatele parțiale ale funcției V în raport cu variabilele t și x* de care depinde, fiecare derivată calculîndu-se pentru valori constante ale celeilalte variabile.

ΔV : *variația mărimii V* între două limite precizate.

$exp\,(x)$ sau e^x : *funcția exponențială*, reprezentînd ridicarea numărului $e = 2{,}71 \cdots$ la puterea x. Numărul e este baza logaritmilor naturali, notați cu *ln* (vezi *logaritm*).

$f(x)$: *funcție* ce depinde de variabila independentă (sau argumentul) x. Fiecărei valori a lui x îi corespunde o valoarea precizată a lui $f(x)$.

$log_a b$: *logaritmul* numărului b în baza a reprezintă puterea la care trebuie ridicată baza a pentru a obține numărul b, adică : $a^{\log_a b} = b$. Atunci cînd baza nu este indicată, se subînțelege a fi 10.

$\sum_{i=1}^{N} f_i$: *suma* tuturor valorilor distincte pe care le ia mărimea f, desemnate prin indicele i, atunci cînd acesta variază de la 1 la N. Este deci : $f_1 + f_2 + \cdots + f_N$.

$\int_{x_1}^{x_2} f(x)\mathrm{d}x$: *integrala* funcției f, atunci cînd argumentul x variază între limitele x_1 și x_2. Întrucît $\mathrm{d}x$ reprezintă o variație infinitezimală a argumentului, integrala este o sumă infinită a produselor dintre valorile funcției în diferitele puncte din intervalul considerat și $\mathrm{d}x$. Operația de integrare este inversă față de derivare, astfel încît :

$$\frac{\mathrm{d}}{\mathrm{d}x}\left[\int f(x)\,\mathrm{d}x\right] = \int\left[\frac{\mathrm{d}f(x)}{\mathrm{d}x}\right]\mathrm{d}x = f(x).$$

INDICE DE TERMENI

A

acetilcolină (AcCh) 25, 116u, 159, 166u, 178u, 198
acetilcolinesterază (AChE) 39, 117u, 167, 179u
aclimatizare 213
acomodare 76
actină 39
activitate electrochimică 55
activităţi ionice 47u, 54
adaptare lentă şi rapidă 212
alameticină 36
algesiometrie, *vezi* dolorimetrie
algoceptori, *vezi* nociceptori
amplitudinea stimulului 22
analizatori 202
anestezice, definire 265u
anestezie, mecanismul biofizic 267
— , regula Mayer-Overton 266
— , teorii 266u
anizotropia optică a bastonaşelor 240
antibiotice macrociclice 34
antidepresive 265
apă deuterată (grea) 42u, 135
— , rolul în membrane 42u, 266
ARN 259, 271
asimetria distribuţiei ionice 45u
astrocite 251
ATP 56u, 61, 134u, 254, *271*
ATP-aza calciului 120
— — de transport a Na^+ şi K^+ 39, 57, 141
autoexcitabilitate 254
axonul gigant de calmar 19, 56u, *69*, 81, 95
axoplasmă 38, 48, 271

B

baroceptori 212
bastonaşe 32, 237
bioelectricitate 14u
bioelectrogeneză 14
biopotenţialele 25, 84
— fotoreceptorilor 242
bioritmuri 255
birefringenţă 20, 108u
bistraturi lipidice, *vezi* filme lipidice bimoleculare
bit 223
bombicol 209u
Bombyx mori 209
bradichinină 234
bungarotoxina (α) 181

C

calciu, rolul în excitaţia nervoasă 93, 122u
— , — — — vizuală 244 u
—, — — transimisia sinaptică 172u
calitatea stimulilor 207
canal de comunicaţie 221
canale ionice 19u, *35u*, 41, 62, 90, 97, 100u, 115
— — , conductanţa 100u
— — din membrana postsinaptică 187u
— — , distribuţia pe membrana axonală 98, 102
— —, structura 102u
cantitate de informaţie 222u
capacitatea canalului neuronal 224u
— membranelor artificiale 34
— — celulare 34, 61, 90

stimul 17, 64, 68, 76, *206*
— adecvat 21
— liminar 83
stimuli, caracteristicile 206u
— dureroşi 229u
strat dublu lipidic 29u, 63
straturile retinei 238
structuri disipative 141
subunităţi membranare 31, 239
sursă de semnale 221

T

tangoceptori 207, 212
taxie 203
teaca de mielină 38, 72, 79
temperatura, efectul asupra receptorilor 226u
—, — — transmisiei sinaptice 171
teoria asociaţiei şi a inducerii 27, 48
— celor doi factori 17
— — două stări stabile 122
— dipolară a excitaţiei, *vezi* ipoteza
teoria eliberării cuantificate de mediatori 25, *174*
— energiilor nervoase specifice 21
— ionică a excitaţiei 19, 69, 80, *84*, 96, 114, 127u
— locurilor complementare, *vezi* ipoteza
— neuronală 23
— rezonanţei 22
— sorbţiei 27
— tricromatică a vederii 22, 246
termoreceptori 207, 226
tetraetilamoniu (TEA) 100, 107, 179
tetrodotoxina (TTX) 98u, 107, 110u
„tot sau nimic", *vezi* legea
traducere analogo-digitală 218
traductori 202, 221
transinformaţie 225
transmisie (sinaptică) chimică 165u
— — electrică 194u
transferul chimic al învăţării 262
transport activ 31, 38, 43, 51u, 63
— axoplasmic 134, 252u
transportori membranari, *vezi* şi ionofori 58u
tranziţii de fază în membrane 34, 191
tropisme 203
tropomiozină 39
trunchi nervos 17
tubocurarina (d) 179, 181
tubulină 39, 227
„turnover" 31, 250

U

undele *P* I; *P* II; *P* III 242u
unitate senzitivă 214

V

valinomicină 37
vezicule cu mediator chimic 166u, 170u
viteza de propagare a influxului nervos 15, 17, 80u

X

Xenopus laevis 80, 96, 145, 151

Z

zgomot (electric) de membrană 101u, 188u

Summary

AN INTRODUCTION TO NEUROBIOPHYSICS

by

V. Vasilescu and D.-G. Mărgineanu

The term NEUROBIOPHYSICS was coined to designate the study of the physico-chemical processes involved in the functioning of the nervous system. Such a study represents the prerequisite for a deep understanding of neurobiology and neurophysiology as a whole but, as the physico-chemical processes belong *de facto* to the functions of the cell, neurobiophysics is restricted to only the cellular level.

Accordingly, this short monograph deals mainly with the general problems of excitable membranes, nerve impulse, synaptic transmission and the generation of impulses within the receptors. Their expounding is preceded by a short survey of the historical development of neurobiophysics and followed by several applications and prospects. A Glossary of usual terms and symbols as well as a Subject Index are also included. The literature quoted, if not exhaustive, is at least representative and up dated, the references being at the end of each chapter, grouped as general and special.

Throughout the book all the main concepts used are defined and explained so that, in spite of its pluridisciplinary character, this monograph is accessible to a wide range of specialists, from biologists and physicians up to physicists, as well as to the students. Nevertheless it is an ,,introductory" one, mostly with respect to the extension of its topics and not as concerns its level.

The detailed contents of this book, listed below, is the most informative image of the topics covered and of its structure.

* * *

Ch. I: **Historical evolution of the neurobiophysical knowledge** . . . 11

I.1. The ,,early age" in the study of excitability 11

I.2. The nerve impulse viewed as an electrical phenomenon . 13

I.3. Studies about the reception and transmission of excitation between cells 21

Ch. II: Membranes and their role in the functioning of excitable cells 27

II.1. The structure of biological membranes: models for the molecular arhitecture of membranes; lipid bilayers; the variety of artificial excitable membranes; water in biological membranes 28

II.2. The resting potential of the cells: intracellular microelectrodes; the resting potential and the ionic distribution in the cell 43

II.3. The active transport: its dependence on the cellular energy metabolism; distinction between passive and active ionic fluxes; Na, K transport ATP-ase; membrane ionic carriers 51

II.4. The description of the membranes by equivalent electrical circuits 61

Ch. III: The nerve impulse 67

III.1. Phenomenology of the electrical activity of nerve fibres: basic microelectrophysiological methods; local and propagated potentials; recurrent and saltatory conduction in nerve fibres; conduction velocity of the nerve impulse 68

III.2. Phenomenology of the electrical activity of the nerve trunk 81

III.3. Electrical currents involved in nerve impulse propagation (the ionic theory of excitation): electrotonic (passive) propagation of electrical signals in cell membranes; cable properties of the membrane; regenerative (active) propagation of signals in excitable membranes; Hodgkin—Huxley equations 84

III.4. Ionic pathways in the axonal membranes during excitation: pharmacology of ionic channels and their distribution in the axolemma; molecular structure of ionic channels; gating currents 97

III.5. Optical changes associated with nerve impulse propagation: birefringence changes; light scattering changes; variations in fluorescence and light absorption of stained nerves during activity 108

III.6. Models and theories about the mechanism of the nerve impulse: biochemical theories; macromolecular theories; dipole theory of excitation; biophysical mechanisms assumed by the ionic theory of excitation 115

Ch. IV: Energy metabolism and thermodynamical problems of nerve activity 133

IV.1. Energy metabolism of the nerve 134
IV.2. Oxygen consumption and heat production in the nerve 136
IV.3. Energy requirements for the active transport in the nerve 141
IV.4. Energy dissipating processes during the action potential: energy dissipation by ionic fluxes during the action potential; energy dissipation by intramembranous redistributions of electric charges; energy changes associated with the permeability cycle of the excitable membrane 146

Ch. V: Synaptic transmission 158
V.1. Structural peculiarities for the chemical and electrical synaptic transmission 160
V.2. The chain of processes in which consists the chemical mediation at synapses: synthesis and enzymatic hydrolysis of acetylcholine; the vesicles containing chemical mediators; quantal character of the release of chemical mediators; mechanism of vesicles release; diffusion of chemical mediator; post-synaptic receptors for acetylcholine 165
V.3. Local post-synaptic potentials: properties of the ionic channels opened by acetylcholine in the post-synaptic membrane at the end plate; physico-chemical phenomena in the post-junctional membranes 183
V.4. Electrically mediated synapses 194
V.5 Synaptic function, types of synapses and mediators 197

Ch. VI:. Biophysical aspects of the functioning of receptor cells . . 202
VI.1. Phylogenetic evolution of receptor structures 203
VI.2. Characteristics of the stimuli and their coding: types of stimuli and the corresponding receptor cells; coding of the intensity and space and time distribution of the stimuli. 206
VI.3. General principles of structure and function of the receptor cells: biopotentials of the receptors 215
VI.4. Sensory information: information content measure; quantity of information of nerve impulses trains . . . 220
VI.5. Biophysical processes in receptors: general hypothesis; membrane phenomena involved in the generation of receptor potentials 225
VI.6. Receptor mechanisms in pain: characteristics of pain sensations; dolorimetry (algesiometry); reception and conduction of pain sensations 229
VI.7. Mechanisms of photoreception: structure of photoreceptors in vertebrata; photochemistry of vision; biopotentials of photoreceptors 235

Ch. VII: Applications and prospects of neurobiophysics 249
VII.1. Special features of celullar dynamics of neurons: interactions of neurons with glial cells; axoplasmic transport of materials; self-excitability of neurons 250
VII.2. Some basic mechanisms of higher nervous activity: learning and memory; chemical transfer of learned information 256
VII.3. Mechanisms of drug actions on the nervous system: basic mechanisms in anesthesia 264

Glossary 271
Subject index 275

Redactor : LAURA MĂRGINEANU
Tehnoredactor : CONSTANTIN IORDACHE

Coli de tipar: 17,75.
Tiraj: 3700 Bun de tipar: 07.04.1970

C. 1975 — I. P. INFORMAȚIA
str. Brezoianu nr. 23—25, București
Republica Socialistă România

Editura ştiinţifică şi enciclopedică

Studiul mecanismelor fizico-chimice fundamentale ale funcţionării sistemului nervos – definit de autorii acestei monografii prin termenul NEUROBIOFIZICĂ – este un domeniu ştiinţific de mare actualitate care îi interesează nemijlocit pe toţi cei implicaţi în probleme conexe cu excitabilitatea: medici neurologi, biofizicieni, fiziologi, biochimişti şi ingineri, studenţi în domeniile respective.

Lucrarea de faţă reprezintă o sinteză accesibilă şi „la zi" a unui material ştiinţific abundent, structurat în jurul ideii că fenomenele determinante pentru manifestarea excitabilităţii celulare se desfăşoară la nivelul membranelor. Analiza cuprinzătoare a problematicii membranelor excitabile, influxului nervos, transmisiei sinaptice şi iniţierii excitaţiei la nivelul receptorilor este precedată de o schiţă a evoluţiei istorice a cunoştinţelor de neurobiofizică şi se încheie prin cîteva ilustrări ale importanţei domeniului.

Lei 13

Scanned with OKEN Scanner

Editura ştiinţifică şi enciclopedică

Studiul mecanismelor fizico-chimice fundamentale ale funcţionării sistemului nervos – definit de autorii acestei monografii prin termenul NEUROBIOFIZICĂ – este un domeniu ştiinţific de mare actualitate care îi interesează nemijlocit pe toţi cei implicaţi în probleme conexe cu excitabilitatea: medici neurologi, biofizicieni, fiziologi, biochimişti şi ingineri, studenţi în domeniile respective.

Lucrarea de faţă reprezintă o sinteză accesibilă şi „la zi" a unui material ştiinţific abundent, structurat în jurul ideii că fenomenele determinante pentru manifestarea excitabilităţii celulare se desfăşoară la nivelul membranelor. Analiza cuprinzătoare a problematicii membranelor excitabile, influxului nervos, transmisiei sinaptice şi iniţierii excitaţiei la nivelul receptorilor este precedată de o schiţă a evoluţiei istorice a cunoştinţelor de neurobiofizică şi se încheie prin cîteva ilustrări ale importanţei domeniului.

Lei 13

Scanned with OKEN Scanner